

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 10-304889

(43)Date of publication of application : 17.11.1998

(51)Int.Cl.

C12N 15/09
 C07H 19/06
 C07H 19/16
 C07H 21/00
 // A61K 31/70
 A61K 31/70
 A61K 48/00

(21)Application number : 10-055114

(71)Applicant : IMANISHI TAKESHI

(22)Date of filing : 06.03.1998

(72)Inventor : IMANISHI TAKESHI
 OBIKA SATOSHI

(30)Priority

Priority number : 09 53409

Priority date : 07.03.1997

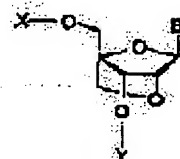
Priority country : JP

(54) NEW BICYCLO NUCLEOTIDE AND OLIGONUCLEOTIDE ANALOGUE

(57)Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To obtain the new subject compound comprising a specific bicyclonucleoside and oligonucleotide analogue, hardly hydrolyzed by an enzyme in vivo, high in binding ability to a sense chain, readily synthesized, and used as an antisense molecule, etc.

SOLUTION: This compound is a nucleoside analogue of formula I (B is pyrimidine or purine nucleic acid base or an analogue thereof; X and Y are each H, an alkyl, an alkenyl, an alkynyl, a cycloalkyl, an aralkyl, an aryl an acyl or a silyl) or an amidite derivative and hardly hydrolyzed by an enzyme in vivo, high in binding ability to a sense chain, readily synthesized, and used for production, etc., of an oligonucleotide analogue used as an antisense molecule, etc., useful as a medicine. The nucleotide analogue is obtained by reacting a nucleic acid base with a compound of formula II (TBDPS is t-butylphenylsilyl; Ts is tosyl; Ac is acetyl; Bn is benzyl), and deacetylating the product to cyclize the product.



II

LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

21.02.2001

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

3756313

[Date of registration]

06.01.2006

[Number of appeal against examiner's decision
of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's
decision of rejection]

[Date of extinction of right]

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平 10 - 3 0 4 8 8 9

(43) 公開日 平成10年(1998)11月17日

(51) Int. Cl. ⁶	識別記号	F I
C 1 2 N 15/09	Z N A	C 1 2 N 15/00 Z N A A
C 0 7 H 19/06		C 0 7 H 19/06
		19/16
		21/00
// A 6 1 K 31/70	A D U	A 6 1 K 31/70 A D U
審査請求 未請求 請求項の数 5	O L	(全 2 1 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願平10-55114

(22) 出願日 平成10年(1998)3月6日

(31) 優先権主張番号 特願平9-53409

(32) 優先日 平9(1997)3月7日

(33) 優先権主張国 日本 (J P)

(71) 出願人 594147039

今西 武

奈良県奈良市千代ヶ丘2丁目2-18

(72) 発明者 今西 武

奈良県奈良市千代ヶ丘2丁目2-18

(72) 発明者 小比賀 聡

大阪府高槻市日吉台四番町2034

(74) 代理人 弁理士 社本 一夫 (外4名)

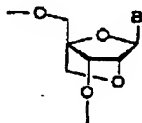
(54) 【発明の名称】 新規ピシクロヌクレオシド及びオリゴヌクレオチド類縁体

(57) 【要約】

【目的】 生体内で酵素の加水分解を受けにくく、センス鎖との結合能が高く、しかも合成が容易であるオリゴヌクレオチド類縁体アンチセンス分子を提供する。

【構成】 一般式：

【化1】



(1a)

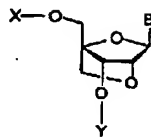
〔式中、Bはピリミジンもしくはプリン核酸塩基又はそれらの類縁体である〕で表される構造を1または2以上有するオリゴまたはポリヌクレオチド類縁体。

1

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 一般式 (I)

【化 1】

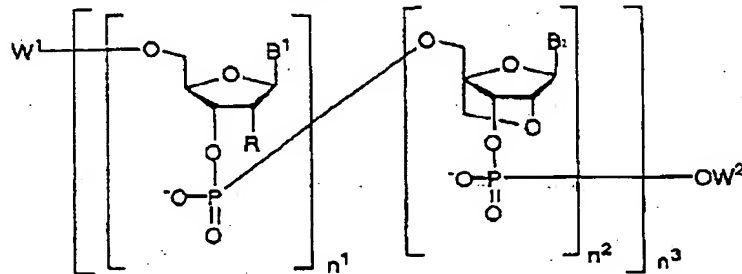


(I)

【式中、Bはピリミジンもしくはプリン核酸塩基又はそれらの類縁体であり、X及びYは同一もしくは異なり、水素、アルキル基、アルケニル基、アルキニル基、シクロアルキル基、アラルキル基、アリール基、アシル基、又はシリル基】で表わされるヌクレオシド類縁体もしくはそのアミダイト誘導体。

【請求項 2】 X、Yがともに水素である請求項 1 記載のヌクレオシド類縁体。

【請求項 3】 Xが 4,4'-ジメトキシトリチル (DMT



(II)

【式中、B¹、Bは同一または異なり、ピリミジンもしくはプリン核酸塩基又はそれらの類縁体であり、Rは水素、水酸基、ハロゲン、またはアルコキシ基であり、W¹、W²は同一または異なり、水素、アルキル基、アルケニル基、アルキニル基、シクロアルキル基、アラルキル基、アリール基、アシル基、シリル基またはリン酸残基もしくはリン酸ジエステル結合を介した天然型ヌクレオシド、及びその類縁体またはこれらヌクレオシドを含むオリゴヌクレオチドもしくはポリヌクレオチドであり、n¹またはn²は同一または異なり、0から50の整数である（ただし、n¹またはn²が同時にゼロになることはない。またn²のすべてがゼロになることはない。）、n³は1～50の整数である、ただし、n¹および/またはn²が2以上の場合にはB¹とBは同一でなくてもよく、Rも同一でなくてもよい】で表されるオリゴヌクレオチドもしくはポリヌクレオチド類縁体。

【発明の詳細な説明】

【0001】

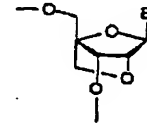
【産業上の利用分野】 本発明は新規なヌクレオシド類縁体とヌクレオチド類縁体に関し、更に詳細にはアンチセンス分子に適したヌクレオチド類縁体に関するものであ

2

r) で、Yが2-シアノエトキシ (ジイソプロピルアミノ) ホスフィノ基 (アミダイト基) である請求項 1 記載のモノヌクレオシドアミダイト誘導体。

【請求項 4】 一般式 (Ia)

【化 2】



(Ia)

【式中、Bはピリミジンもしくはプリン核酸塩基又はそれらの類縁体である】で表される構造を 1 または 2 以上有するオリゴヌクレオチドまたはポリヌクレオチド類縁体。

【請求項 5】 一般式 (II)

【化 3】

30 する。

【0002】

【従来の技術】 1978年にアンチセンス分子がインフルエンザウィルスの感染を阻害したとの報告が初めて成された。以後、ガン遺伝子発現やAIDS感染を阻害したとの報告もなされている。アンチセンスオリゴヌクレオチドが望ましくない遺伝子の発現を特異的に制御することから、医薬品として近年、最も期待されている分野の一つである。

【0003】 アンチセンス法とは、DNA→RNA→タンパク質という、いわゆるセントラルドグマの一連の流れをアンチセンスオリゴヌクレオチドを用いて制御しようという概念に基づいている。

【0004】 しかしながら、天然型オリゴヌクレオチドをアンチセンス分子としてこの方法に適用した場合、生体内の各種ヌクレアーゼにより分解を受けたり、細胞膜透過性が高くないなどの問題が生じた。そのため、様々な核酸誘導体や類縁体が数多く合成され、研究が重ねられてきた。例えば、リン原子上の酸素原子をイオウ原子に置換したホスホロチオエート、メチル基に置換したメチルホスホネート、また最近になっては、リン原子も炭

素原子で置換したもの、さらには糖部の構造を変換したもの、核酸塩基を修飾したものなども合成されている。しかし、いずれの場合も、生体内での安定性、合成の容易さ、配列特異性（特定の遺伝子発現のみを選択的に制御する）などの点で十分に満足いく誘導体や類縁体が得られていないのが現状である。

【0005】

【発明が解決しようとする課題】生体内でヌクレアーゼによる分解を受けにくく、高い親和力で標的のメッセンジャーRNAに結合し、その特異性に優れ、よって特定の遺伝子の発現を効率よく制御することのできるアンチセンス用の分子の創製が望まれている。

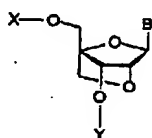
【0006】

【課題を解決するための手段】本発明の発明者らは、アンチセンス法において有用と考えられる、核酸における糖部のコンホメーションの固定化を施した核酸類縁体を設計し、その単位構造となるヌクレオシド類縁体の合成を行い、これを用いて調製したオリゴヌクレオチド類縁体にアンチセンス分子として極めて有用であることを確認した。以下に本発明の詳細を説明する。

【0007】本発明のヌクレオシド類縁体の構造は下記の一般式(1)で表すことができる。

【0008】

【化4】



(1)

【式中、Bはピリミジンもしくはプリン核酸塩基又はそれらの類縁体であり、X及びYは同一もしくは異なり、水素、アルキル基、アルケニル基、アルキニル基、シクロアルキル基、アラルキル基、アリール基、アシル基、又はシリル基である】で表わされるヌクレオシド類縁体もしくはそれらのアミダイト誘導体である。

【0009】アルキル基とは炭素数1-20の直鎖または分枝鎖状のアルキル基を示し、例えば、メチル基、エチル基、n-プロピル基、i-プロピル基、n-ブチル基、t-ブチル基、ペンチル基、ヘキシル基、ヘプチル基、オクチル基、ノニル基、デシル基等があげられる。

【0010】アルケニル基とは、炭素数2-20の直鎖または分枝鎖状のアルケニル基を示し、例えば、ビニル基、アリル基、ブテニル基、ペンテニル基、ゲラニル基、ファルネシル基等があげられる。

【0011】アルキニル基とは、炭素数2-20の直鎖または分枝鎖状のアルキニル基を示し、例えば、エチニル基、プロピニル基、ブチニル基等があげられる。

【0012】シクロアルキル基とは、炭素数3-8のシクロアルキル基を示し、例えば、シクロプロピル基、シ

クロブチル基、シクロペンチル基、シクロヘキシル基、シクロヘプチル基、シクロオクチル基等があげられる。シクロアルキル基の環上の1つ以上の任意のメチレンが酸素原子や硫黄原子あるいはアルキル基で置換された窒素原子に置換された複素環基も含まれ、例えばテトラヒドロピラニル基などがあげられる。

【0013】アリール基とは、芳香族複素環基又は芳香族炭化水素基、から水素原子1個を除いた1価の置換基を意味し、好ましくは、芳香族炭化水素基から水素原子1個を除いた1価の置換基を意味し、例えば、フェニル基、トリル基、キシリル基、ビフェニル基、ナフチル基、アントリル基、フェナントリル基等である。また、アリール基の環上の炭素原子はハロゲン原子、低級アルキル基、水酸基、アルコキシ基、アミノ基、ニトロ基、トリフルオロメチル基等の1種以上の基によって置換されていてもよい。置換基としてはハロゲン原子、水酸基、アミノ基、アルコキシ基、アリールオキシ基等があげられる。

【0014】アラルキル基とは、アリール基にアルキル基が結合した基で、アラルキル基は置換されていてもよい。置換されていてもよいアラルキル基とはアリール基にアルキル基が結合した基で、アリール基及びアルキル基の任意の1つ以上の水素原子が以下の置換基で置換されていてもよい基を意味する。ここで置換基としては、アシル基、アミノ基、アリール基、アルキル基、シクロアルキル基、アルコキシ基、水酸基、ニトロ基、ハロゲン原子等がある。

【0015】アミノ基は置換されていてもいなくてもよいが、置換されているアミノ基の例としてはアルキルアミノ基、アリールアミノ基、アシルアミノ基等がある。アルコキシ基の例としては、メトキシ基、エトキシ基、n-プロポキシ基、i-プロポキシ基、n-ブトキシ基、i-ブトキシ基、s-ブトキシ基、t-ブトキシ基、ベンチルオキシ基、ヘキシルオキシ基、フェノキシ基等がある。ハロゲン原子としてはフッ素、塩素、臭素、ヨウ素がある。

【0016】アラルキル基の好ましい例としては、例えばトリチル基、ベンジル基、フェネチル基、トリチルメチル基、ジフェニルメチル基、ナフチルメチル基、4,4'-ジメトキシトリチル(DMTTr)基等があるが、特に好ましいのはDMTTr基である。

【0017】アシル基としては、アセチル基、ホルミル基、プロピオニル基、ベンゾイル基、ベンジルオキシカルボニル基等があげられる。シリル基の例としては、トリアルキルシリル基があげられるが、好ましくは、トリメチルシリル基、トリエチルシリル基、トリイソプロピルシリル基、t-ブチルジメチルシリル基、t-ブチルジフェニルシリル基等があげられ、更に好ましくはトリメチルシリル基である。

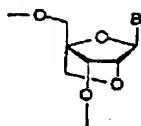
【0018】また、本発明のヌクレオチド類縁体は、一

5

6

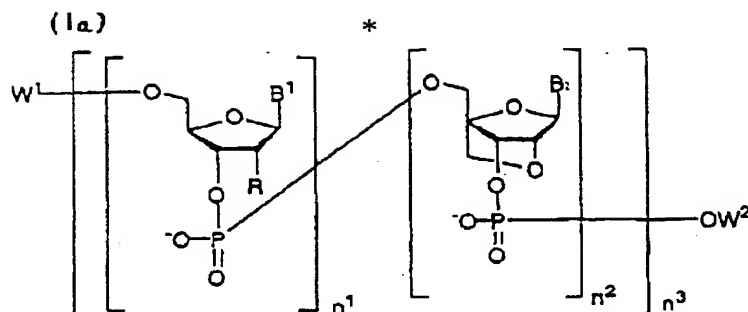
般式 (I a)

【化5】



* [式中、Bはピリミジンもしくはプリン核酸塩基又はそれらの類縁体である] で表される構造を1または2以上有するオリゴヌクレオチドまたはポリヌクレオチド類縁体、または、一般式 (II)

【化6】



(II)

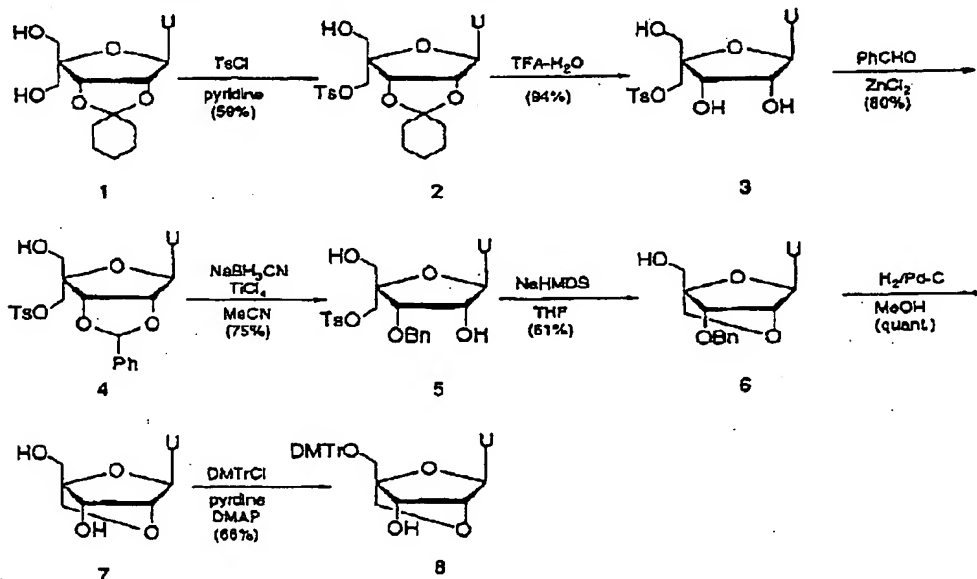
[式中、B¹、Bは同一または異なり、ピリミジンもしくはプリン核酸塩基又はそれらの類縁体であり、Rは水素、水酸基、ハロゲン、またはアルコキシ基であり、W¹、W²は同一または異なり、水素、アルキル基、アルケニル基、アルキニル基、シクロアルキル基、アラルキル基、アリール基、アシル基、シリル基またはリン酸残基もしくはリン酸ジエステル結合を介した天然型ヌクレオシド、合成ヌクレオシドまたはこれらヌクレオシドを含むオリゴヌクレオチドもしくはポリヌクレオチドであり、n¹またはn²は同一または異なり、0～50の整数である (ただし、n¹またはn²が同時にゼロになることはない。また、n²の全てが同時にゼロになることはな

※い。)、n³は1～50の整数である、ただし、n¹および/またはn²が2以上の場合にはB¹とBは同一でなくともよく、Rも同一でなくともよい] で表されるオリゴヌクレオチドもしくはポリヌクレオチド類縁体である。

【0019】本発明における、ピリミジンもしくはプリン核酸塩基とは、チミン、ウラシル、シトシン、アデニン、グアニン及びそれらの誘導体である。

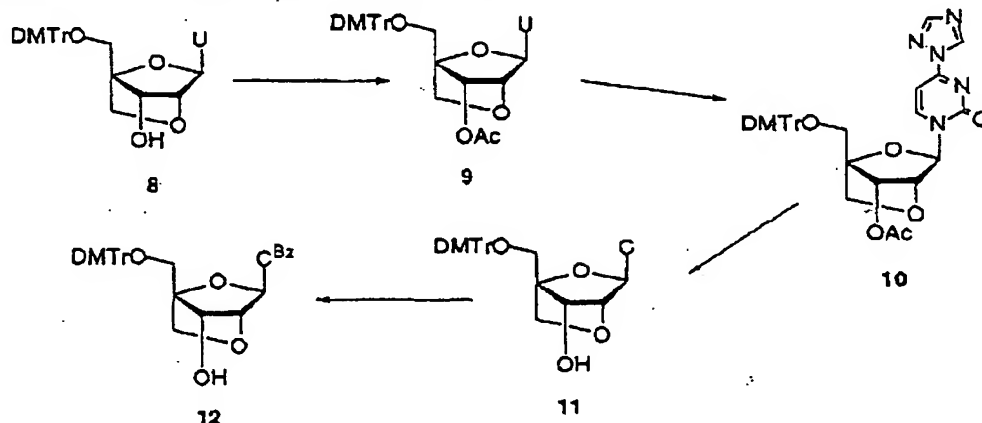
【0020】本発明のヌクレオシド類縁体及びヌクレオチド類縁体は次のように合成できる。

【0021】(1)ヌクレオシド類縁体の合成
【化7】



【0022】ウリジンから文献 [J. A. Secrist et al., J. Am. Chem. Soc., 101, 1554 (1979); G. H. Jone

s et al., J. Org. Chem., 44, 1309 (1979)] に従い合成した化合物1をトシルクロリド (TsCl) で2個ある第一級アルコールの一方のみをトシル化して化合物2に導き、酸加水分解してトリオール体3とした。化合物3はベンズアルデヒドと酸触媒下で縮合反応を行いベンジリデン化合物4として、このものを四塩化チタン (TiCl₄) 存在下にナトリウムシアノボロヒドリド (NaBH₃CN) で還元すると化合物5が得られた。本化合物をテトラヒドロフラン (THF) 中でナトリウムヘキサメチルジシラジド (NaHMDS) と反応させたところ、ビスクロ化合物6 (化合物I: B=ウラシル (U), X=H, Y=ベンジル) が得られた。化合物6をパラジウム炭素触媒下で接触還元すると、ジオール化合物7 (化合物I: B=U, X=Y=H) が得られ、更に、4, 4'-ジメトキシトリチルクロリド (DMTrCl) 処理するとトリチル体8 (化合物I: B=U, X=DMTr, Y=H) が得られた。化合物6、7*



【0026】第二の方法はD-リボースから文献 [1) A.G.M. Barrett et al., J. Org. Chem., 55, 3853 (1990); 2) G.H. Jones et al., ibid., 44, 1309 (1979)] に従って容易に得られる化合物13を経由する方法である。すなわち、化合物13を3工程で化合物16に導き、塩基性条件下に閉環反応すると、目的のメチルグリコシル化合物17が得られた。本化合物の1位OMe基

*及び8は様々な化合物Iの原料として利用することができる。

【0023】ウリジン以外の天然・非天然を問わず様々な核酸塩基を有する化合物 (I) は3通りの方法で合成することができる。

【0024】その一つは、化合物8からの変換である。すなわち、化合物8をアセチル化して化合物9とした後、1, 2, 4-トリアゾールと反応して化合物10に導き、加水分解すると化合物11 (化合物 (I); B=シトシン (C), X=DMTr, Y=H) が得られた。オリゴヌクレオチド合成の原料となる化合物12 (化合物 (I); B=ベンゾイルシトシン (C^{Bz}), X=DMTr, Y=H) は化合物11のベンゾイル化で容易に得られる。

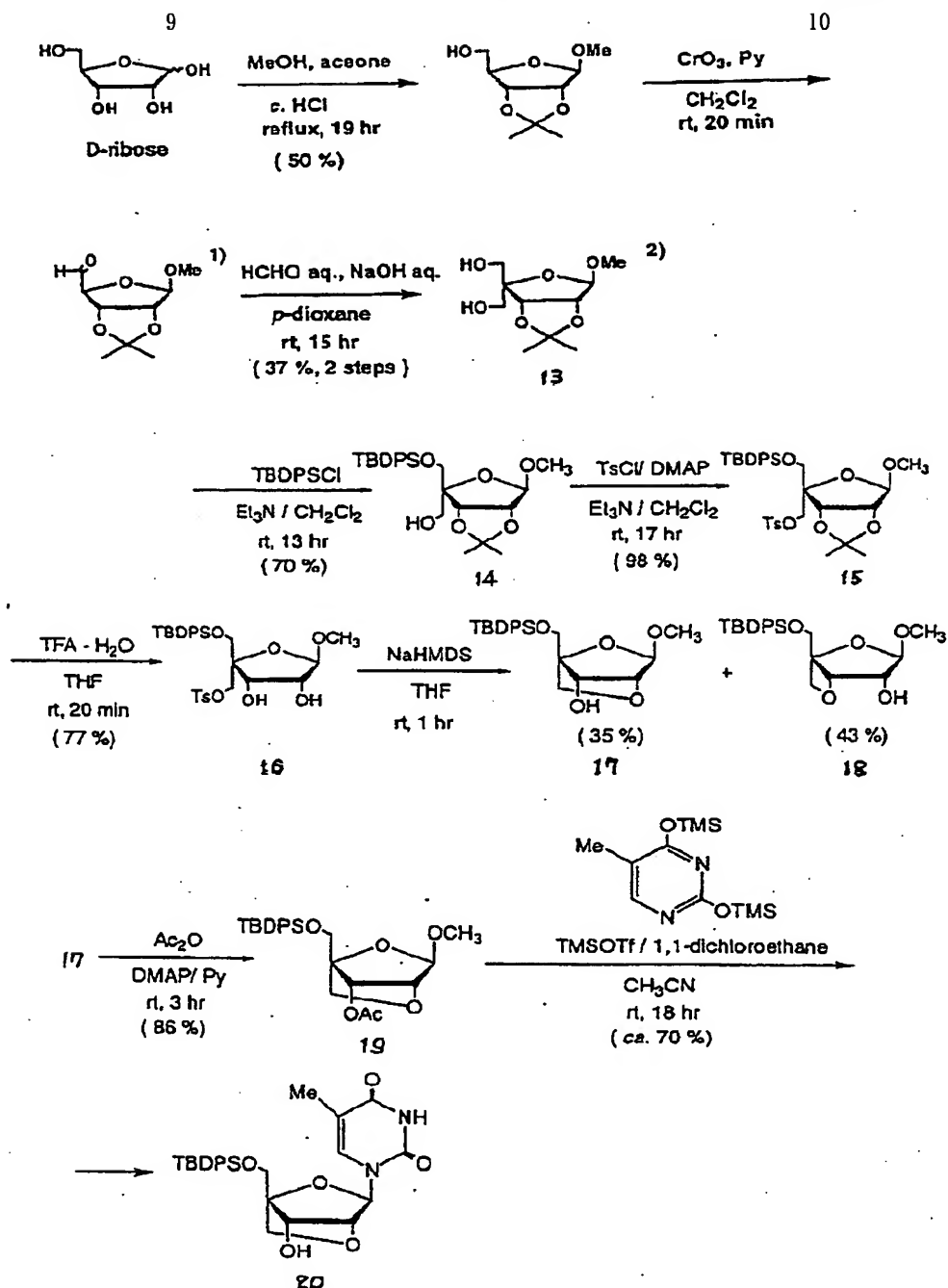
【0025】

【化8】

を天然の様々な核酸塩基や非天然の核酸塩基類縁体に置換するには、既に開発された種々の方法により可能である。例えば、下式化合物17から化合物20のような方法が使用できる。

【0027】

【化9】

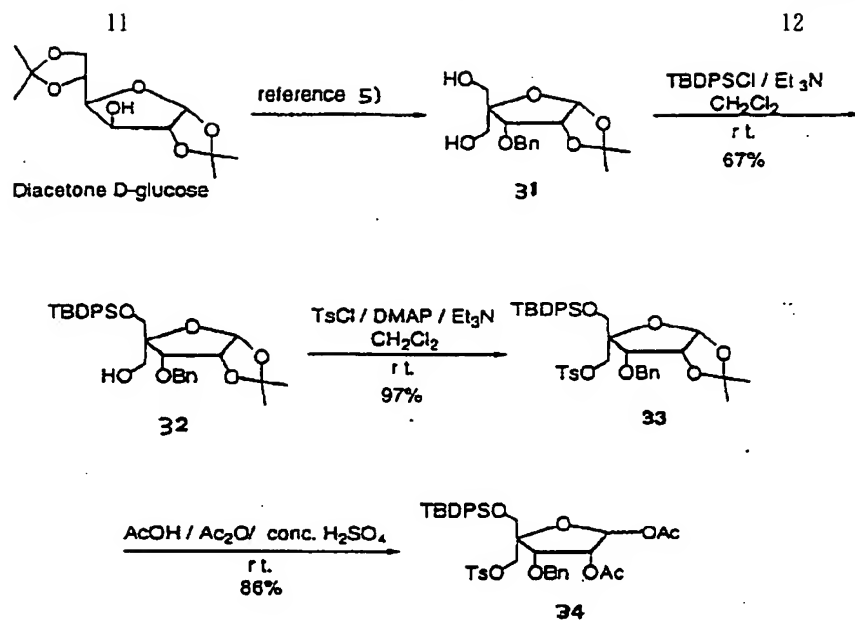


【0028】さらに、第三の方法としては、D-グルコースから1工程で得られ、しかも市販品であるジアセトン D-グルコースを出発原料とする方法である。文献 5) R. D. Youssefyeh, J. P. H. Verheyden and J. G. Moffatt, J. Org. Chem., 44, 1301-1309 (1979) に従って化合物 31 を調製する。次いで、化合物 31 を下記の

式に示した通り、2種の1級水酸基を t-ブチルジフェニルシリル基、p-トルエンスルホニル基で段階的に保護し、アセチル化処理して化合物 34 に導いた。

【0029】

【化10】

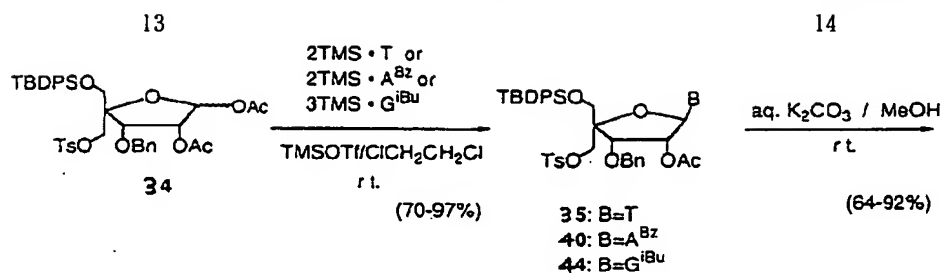


【0030】化合物34にトリメチルシリル化して活性化
化したチミン (2TMS・T)、ベンゾイルアデニン (2
TMS・A^{Bz})、イソブチリルグアニン (3TMS・G
ⁱBu) を別々に縮合させ、下記の式に示すように、化合
物5、10、14をそれぞれ高収率で得た。ついで、こ
れら縮合体は脱アセチル化 (化合物36、41、4

5)、5員環形成 (化合物37、42、46)、脱シリ
ル化 (化合物38、43、47)、更に脱ベンジル化し
て目的の化合物39へと誘導した。

【0031】

【化11】

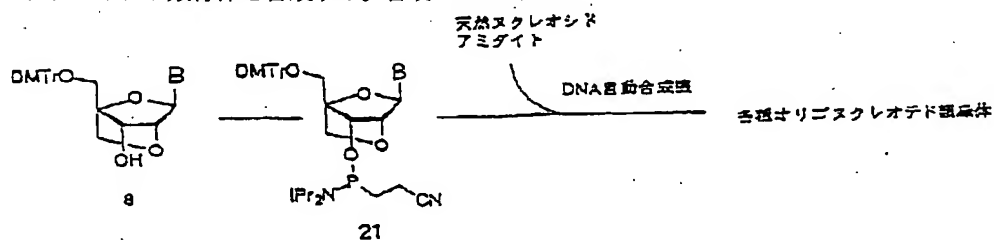


【0032】(2)オリゴヌクレオチド類縁体の合成
化合物8に2-シアノエチル-N, N', N'-
テトライソプロピルホスホロアミダイトを作用させ、ア
ミダイト体21を得、このものと天然ヌクレオシドアミ
ダイト体とを組み合わせ、DNA自動合成機を用いて
種々のオリゴヌクレオチド類縁体を合成する。合成した*40

*粗生成物はオリゴバック、逆相クロマトカラムを用いて
精製し、精製物の純度をHPLCで分析することにより
確認する。

【0033】

【化12】



【0034】化合物8のモノマーユニットは、オリゴヌ
クレオチド類縁体の中に1つ以上存在させることができ

る。また、オリゴヌクレオチド類縁体の中の2ヶ所以上
50の位置に、1または2以上の天然ヌクレオチドを介して

隔離された状態で存在させても良い。本発明に依れば、本発明のヌクレオチド類縁体(ヌクレオシド類縁体)を必要な位置に必要な数(長さ)で導入したアンチセンス分子を合成することができる。オリゴヌクレオチド類縁体全体の長さとしてヌクレオシド単位が2~50、好ましくは10~30個である。

【0035】このようなオリゴヌクレオチド類縁体(アンチセンス分子)は、各種ヌクレアーゼに対して分解されにくく、生体への投与後、長時間生体内に存在することができる。そして、例えば、メッセンジャーRNAと安定な二重鎖を形成して病因となるタンパク質の生合成を阻害したり、ゲノム中の二重鎖DNAとの間で三重鎖を形成して、メッセンジャーRNAへの転写を阻害する。また、感染したウイルスの増殖を抑えることも可能となる。

【0036】これらのことから、本発明のヌクレオシド類縁体を用いたオリゴヌクレオチド類縁体(アンチセンス分子)は、抗腫瘍剤、抗ウイルス剤をはじめとした、特定遺伝子の働きを阻害して疾病を治療する医薬品としての有用性が期待される。

【0037】本発明のヌクレオチド(ヌクレオチド)類縁体を用いたアンチセンス分子は、例えば、緩衝剤および/または安定剤等の慣用の助剤を配合して非経口投与製剤としたり、リボソーム製剤とすることができる。また、局所用の製剤としては、慣用の医薬用担体を配合して軟膏、クリーム、液剤、または膏薬等に調剤できる。

【0038】実施例では、塩基としてウラシルを主として使用しているが、他のプリン核酸塩基も同様に使用できる。

【0039】

【実施例】本発明のヌクレオシド類縁体ならびにヌクレオチド類縁体の合成を実施例および製造例により、さらに詳しく説明する。

【0040】【実施例1】ヌクレオシド類縁体の合成

(1) 2', 3'-O-シクロヘキシリデン-4'-(p-トルエンスルホンルオキシメチル)ウリジン(2)の合成

窒素気流下、文献既知化合物1(956 mg, 2.70 mmol)の無水ピリジン溶液(13.5 ml)に室温でp-トルエンスルホンルクロリド(771 mg, 4.05 mmol)を加え、60℃で5時間攪拌した。

【0041】反応溶液に飽和重曹水を加えた後、ベンゼンで3回抽出した。有機層を飽和食塩水で1回洗浄後、無水MgSO₄にて乾燥した。溶媒を減圧留去し、ベンゼンで3回共沸し、得られた粗成績体をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(CHCl₃:MeOH = 15:1)により精製後、ベンゼン-ヘキサンにて再沈澱し、白色粉末として化合物2(808 mg, 1.59 mmol, 59%)を得た。

【0042】化合物2: 白色粉末 mp 104-106℃(ベンゼン-ヘキサン)。IR ν (KBr): 3326, 2929, 2850, 1628, 1577, 1544, 1437, 1311, 1244 cm⁻¹。 ¹H-NMR (d₆-

acetone): δ 1.45-1.67 (10H, m), 2.45 (3H, s), 3.71 (2H, ABq, J = 12 Hz), 4.20 (2H, ABq, J = 11 Hz), 4.92 (1H, d, J' = 6 Hz), 5.05, 5.06 (1H, dd, J = 4, 6 Hz), 5.60 (1H, d, J = 7 Hz), 5.75 (1H, d, J = 4 Hz), 7.48 (2H, d, J = 8 Hz), 7.77 (1H, d, J = 8 Hz), 7.81 (2H, d, J = 8 Hz), 10.10 (1H, s)。 ¹³C-NMR (d₆-acetone): δ 21.5, 24.1, 24.5, 25.5, 34.8, 36.9, 63.5, 69.7, 82.5, 84.7, 87.8, 92.9, 102.9, 115.4, 128.8, 130.8, 133.9, 142.7, 145.9, 151.3, 163.5。 Mass (EI): m/z 481 (M⁺ - H₂O)。

Anal. Calcd for C₂₃H₂₈N₂O₆S·1/3 H₂O: C, 53.69; H, 5.61; N, 5.44; S, 6.22。 Found: C, 53.99; H, 5.48; N, 5.42; S, 6.10。

【0043】(2) 4'-(p-トルエンスルホンルオキシメチル)ウリジン(3)の合成

化合物2(107 mg, 0.21 mmol)をTFA-H₂O(98:2, 1 ml)中室温で10分間攪拌した。反応溶液を減圧留去し、EtOHを加えて3回共沸した。得られた粗成績体をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(CHCl₃:MeOH = 10:1)により精製し、化合物3(85.0 mg, 0.20 mmol, 94%)を得た。

【0044】化合物3: 白色粉末 mp 119-120℃。IR ν (KBr): 3227, 3060, 2932, 2837, 1709, 1508, 1464, 1252, 978, 835, 763, 556 cm⁻¹。 ¹H-NMR (d₆-acetone): δ 2.31 (3H, s), 2.84 (3H, s), 3.71 (2H, s), 4.13, 4.20 (2H, ABq, J = 11 Hz), 4.28, 4.31 (1H, dd, J' = 9, 6 Hz), 4.36 (1H, d, J' = 6 Hz), 5.54 (1H, d, J' = 8 Hz), 5.75 (1H, d, J = 7 Hz), 7.32 (2H, d, J = 8 Hz), 7.67 (2H, d, J = 8 Hz), 7.70 (1H, d, J' = 8 Hz), 10.14 (1H, s)。 ¹³C-NMR (d₆-acetone): δ 21.5, 63.7, 70.8, 72.7, 74.6, 86.8, 88.8, 103.1, 128.8, 130.7, 133.9, 141.7, 145.8, 151.8, 163.9。 Mass (EI): m/z 256 (M⁺ - OTs)。

【0045】(3) 2', 3'-O-ベンジリデン-4'-(p-トルエンスルホンルオキシメチル)ウリジン(4)の合成

窒素気流下、化合物3(400 mg, 0.93 mmol)にベンズアルデヒド(2.4 ml, excess)、塩化亜鉛(670 mg, 5.0 mmol)を加え室温にて5時間攪拌した。反応を飽和重曹水により止め、クロロホルムで抽出し、飽和重曹水、水、飽和食塩水で洗浄した。有機層を無水硫酸ナトリウムで乾燥し、溶媒留去後シリカゲルカラムクロマトグラフィー(CHCl₃:MeOH = 40:1)により精製し、化合物4(380 mg, 0.74 mmol, 80%)を得た。

【0046】化合物4: 白色粉末 mp 99-102℃(CH₂Cl₂-ヘキサン)。[α]_D²³ -26.7°(c = 1.0, CHCl₃)。IR ν (KBr): 3059, 1691, 1460, 1362, 1269, 1218, 1177 cm⁻¹。 ¹H-NMR (CDCl₃): δ 2.41 (3H, s), 3.25 (1H, br), 3.79 (2H, m), 4.19 (2H, s), 5.09 (1H, d, J = 7 Hz), 5.28 (1H, dd, J = 3, 7 Hz), 5.60 (1H, d, J = 4

H₂), 5.73 (1H, d, J = 8 Hz), 5.94 (1H, s), 7.24 (1H, d, J = 8 Hz), 7.38 (2H, d, J = 9 Hz), 7.42 (5H, br), 7.69 (2H, d, J = 9 Hz), 9.11 (1H, br). ¹³C-NMR (CDCl₃): δ 21.6, 63.5, 68.3, 77.2, 82.8, 84.2, 87.7, 94.9, 102.6, 107.5, 126.5, 127.9, 128.5, 129.7, 132.2, 135.0, 143.0, 145.0, 150.4, 163.5. Anal. Calcd for C₂₄H₂₄N₂O₉S·1/3 H₂O: C, 55.17; H, 4.76; N, 5.36; S, 6.14. Found: C, 55.19; H, 4.66; N, 5.29; S, 5.98.

【0047】(4) 3'-O-ベンジル-4'-(p-トルエンスルホニルオキシメチル)ウリジン (5) の合成
窒素気流下、化合物 4 (150 mg, 0.29 mmol) のアセトニトリル溶液 (3 ml) にシアノ水素化ホウ素ナトリウム (92 mg, 1.5 mmol) を室温にて加えた。その後、四塩化タン (0.16 ml, 1.5 mmol) を氷冷下で滴下し室温にて 15 時間攪拌した。反応液をクロロホルムに希釈して飽和重曹水、水、飽和食塩水で洗浄したのち有機層を無水硫酸ナトリウムで乾燥し、溶媒留去後シリカゲルカラムクロマトグラフィー (CHCl₃:MeOH = 25:1) により精製し、化合物 5 (112 mg, 0.22 mmol, 75%) を得た。

【0048】化合物 5: 無色結晶。mp 195-197℃ (AcOEt-ヘキサン)。[α]_D²³ -14.6° (c = 1.0, CHCl₃)。IR ν (KBr): 3033, 2885, 2820, 1726, 1470, 1361, 1274, 1175, 1119 cm⁻¹。¹H-NMR (CDCl₃) δ: 2.40 (3H, s), 3.59-3.77 (3H, m), 4.10, 4.24 (2H, AB, J = 11 Hz), 4.32 (1H, d, J = 6 Hz), 4.56 (2H, m), 4.69 (1H, d, J = 11 Hz), 5.52 (1H, d, J = 6 Hz), 5.67 (1H, d, J = 8 Hz), 7.24-7.29 (7H, m), 7.48 (1H, d, J = 8 Hz), 7.70 (2H, d, J = 9 Hz), 9.91 (1H, s)。¹³C-NMR (CDCl₃): δ 21.6, 63.2, 69.2, 73.6, 74.6, 78.1, 86.6, 92.9, 102.5, 127.9, 128.2, 128.3, 128.6, 129.9, 132.3, 136.9, 142.4, 145.2, 150.7, 163.8. Anal. Calcd for C₂₄H₂₆N₂O₉S: C, 55.59; H, 5.05; N, 5.40; S, 6.18. Found: C, 55.41; H, 5.02; N, 5.32; S, 6.15.

【0049】(5) 3'-O-ベンジル-2'-O, 4'-C-メチレンウリジン (6) の合成
窒素気流下、化合物 5 (80 mg, 0.16 mmol) の無水 THF 溶液 (1.5 ml) に室温で NaHMDS (3.2 mmol) の無水ベンゼン懸濁液 (0.7 ml) を加え、室温で 20 時間攪拌した。反応溶液に飽和重曹水を加え、CHCl₃ にて抽出した。有機層を飽和食塩水で洗浄した後、無水硫酸ナトリウムにて乾燥した。溶媒を減圧留去し、得られた粗成績体をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (CHCl₃:MeOH = 10:1) にて精製後、MeOH にて再結晶し、化合物 6 (41 mg, 0.10 mmol, 61%) を得た。

【0050】化合物 6: 無色結晶。mp 217-219℃ (MeOH)。[α]_D²³ +108.4° (c = 0.3, MeOH)。IR ν (KBr): 3059, 2951, 1688, 1459, 1271, 1053 cm⁻¹。¹H-NMR (d₆-DMSO) δ: 3.75, 3.85 (2H, AB, J = 8 Hz), 3.77

(2H, d, J = 5 Hz), 3.92 (1H, s), 4.44 (1H, s), 4.60 (2H, s), 5.39 (1H, t, J = 5 Hz), 5.48 (1H, s), 7.31 (5H, m), 7.72 (1H, d, J = 8 Hz), 11.37 (1H, s)。¹³C-NMR (d₆-DMSO): δ 56.0, 71.1, 71.6, 75.8, 76.5, 86.5, 88.3, 100.9, 127.4, 127.6, 128.2, 137.9, 139.0, 150.0, 163.3. Mass (EI): m/z 346 (M⁺, 1.1). Anal. Calcd. for C₁₇H₁₈N₂O₆: C, 58.96; H, 5.24; N, 8.09. Found: C, 58.67; H, 5.23; N, 8.05.

【0051】(6) 2'-O, 4'-C-メチレンウリジン (7) の合成

化合物 6 (25 mg, 0.072 mmol) のメタノール溶液 (2.5 ml) に 10% Pd-C (25 mg) を加え、水素気流下、常圧にて 15 時間攪拌した。反応液を濾過し、溶媒留去後、シリカゲルカラムクロマトグラフィー (CHCl₃:MeOH = 10:1 then 5:1) にて精製し、7 (18.3 mg, quant.) を得た。

【0052】化合物 7: 無色結晶。mp 239-243℃ (MeOH)。[α]_D²³ +92.2° (c = 0.3, MeOH)。IR ν (KBr): 3331, 3091, 3059, 2961, 1689, 1463, 1272, 1049 cm⁻¹。¹H-NMR (CD₃OD) δ: 3.76, 3.96 (2H, AB, J = 8 Hz), 3.90 (2H, s), 4.04 (1H, s), 4.28 (1H, s), 5.55 (1H, s), 5.69 (1H, d, J = 8 Hz), 7.88 (1H, d, J = 8 Hz)。

Anal. Calcd. for C₁₆H₁₂N₂O₆: C, 46.88; H, 4.72; N, 10.93. Found: C, 46.74; H, 4.70; N, 10.84.

【0053】(7) 5'-O-(4, 4'-ジメトキシトリチル)-2'-O, 4'-C-メチレンウリジン (8) の合成

化合物 7 (140 mg, 0.53 mmol) に無水ピリジンを加えて 3 回共沸した後、無水ピリジン溶液 (1.5 ml) とし、窒素気流下、室温で 4, 4'-ジメトキシトリチルクロリド (210 mg, 0.63 mmol)、DMAP (6.5 mg, 0.053 mmol) を加え室温で 5 時間攪拌した。反応溶液に飽和重曹水を加えた後、CH₂Cl₂ で抽出した。有機層を水、飽和食塩水で洗浄後、無水硫酸ナトリウムにて乾燥した。溶媒を減圧留去し、得られた粗成績体をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (CHCl₃:MeOH = 40:1) により精製し、化合物 8 (230 mg, 0.34 mmol, 66%) を得た。

【0054】化合物 8: 白色粉末。mp 117-120℃ (CHCl₃)。[α]_D²³ +17.2° (c = 1.0, CHCl₃)。IR ν (KBr): 3393, 3101, 2885, 1689, 1464, 1272, 1047 cm⁻¹。¹H-NMR (CDCl₃) δ: 2.59 (1H, br), 3.56 (2H, q, J = 7.11 Hz), 3.87 (1H, d, J = 7 Hz), 4.26 (1H, s), 4.47 (1H, s), 5.60 (1H, d, J = 9 Hz), 5.63 (1H, s), 5.84 (4H, d, J = 9 Hz), 7.22-7.45 (9H, m), 7.93 (1H, d, J = 9 Hz)。

【0055】[実施例 2] ヌクレオシド類縁体の合成
(1) メチル=5-O-(4'-ヒドロキシメチル)-2, 3-O-イソプロピリデン-β-D-リボフラノシド (14) の合成

窒素気流下、文献既知化合物 13 (2.00g, 8.54mmol) の

無水 CH_2Cl_2 溶液 (40ml) に氷冷下で Et_3N (2.62ml, 18.8 mmol)、 α -ブチルジフェニルシリルクロリド (4.88ml, 18.8 mmol) を加え、室温で 13 時間攪拌した。反応溶液に飽和重曹水を加えた後、 AcOEt で 3 回抽出した。有機層を飽和食塩水で 1 回洗浄後、無水 Na_2SO_4 にて乾燥した。溶媒を減圧留去し、得られた粗成績体をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (ヘキサン : AcOEt = 5:1) により精製し、無色油状物質 14 (2.82g, 5.98 mmol, 70%) を得た。

【0056】 $[\alpha]_D^{17}$ -16.2° (c = 0.52, CHCl_3) IR_{ν} (KBr): 3510, 3061, 2938, 2852, 1465, 1103 cm^{-1} .

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ : 1.09 (9H, s), 1.28 (3H, s), 1.49 (3H, s), 3.22 (3H, s), 3.67, 3.76 (2H, AB, J = 11 Hz), 3.88, 3.93 (2H, AB, J = 11 Hz), 4.49 (1H, d, J = 6 Hz), 4.57 (1H, d, J = 6 Hz), 4.93 (1H, s), 7.38-7.43 (6H, m), 7.67 (4H, d, J = 7 Hz).

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3) δ : 19.2, 24.4, 25.9, 26.9, 55.0, 62.9, 64.8, 82.2, 85.9, 88.7, 108.6, 112.6, 127.8, 129.9, 133.0, 135.7.

Anal. Calcd for $\text{C}_{26}\text{H}_{36}\text{O}_5\text{Si} \cdot 1/4 \text{H}_2\text{O}$: C, 65.45; H, 7.71. Found: C, 65.43; H, 7.59.

【0057】 (2) メチル = 5-O- (α -ブチルジフェニルシリル) - 2, 3-O-イソプロピリデン-4- (p-トルエンスルホンニルオキシメチル) - β -リボフラノシド (15) の合成

窒素気流下、化合物 (2.13g, 4.51 mmol) の無水 CH_2Cl_2 溶液 (15ml) に室温で Et_3N (3.92g, 28.0 mmol)、p-トルエンスルホンクロリド (1.34g, 7.22 mmol)、4-ジメチルアミノピリジン (90mg, 0.72 mmol) を加え、室温で 17 時間攪拌した。反応溶液に飽和重曹水を加えた後、 AcOEt で 3 回抽出した。有機層を飽和食塩水で 1 回洗浄後、無水 Na_2SO_4 にて乾燥した。溶媒を減圧留去し、得られた粗成績体をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (ヘキサン : AcOEt = 10:1) により精製し、無色油状物質 15 (2.76g, 4.42 mmol, 98%) を得た。

【0058】 $[\alpha]_D^{17}$ -3.82° (c = 0.56, CHCl_3) IR_{ν} (KBr): 2934, 2852, 1369, 1104 cm^{-1} .

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ : 1.02 (9H, s), 1.20 (3H, s), 1.32 (3H, s), 2.41 (3H, s), 3.09 (3H, s), 3.51, 3.77 (2H, AB, J = 10 Hz), 4.34 (1H, d, J = 6 Hz), 4.25, 4.39 (2H, AB, J = 9 Hz), 4.47 (1H, d, J = 6 Hz), 4.77 (1H, s), 7.28, 7.81 (4H, AB, J = 9 Hz), 7.39-7.44 (6H, m), 7.62-7.65 (4H, m), 7.81 (2H, d, J = 9 Hz).

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3) δ : 19.2, 21.6, 24.5, 25.8, 26.8, 54.9, 62.7, 68.8, 81.9, 85.6, 87.5, 108.7, 112.8, 127.7, 127.8, 128.2, 129.6, 129.9, 132.9, 135.6, 144.4.

Anal. Calcd for $\text{C}_{33}\text{H}_{42}\text{O}_5\text{SSi}$: C, 63.23; H, 6.75; S, 5.11. Found: C, 62.99; H, 6.53; S, 5.13.

【0059】 (3) メチル = 5-O- (α -ブチルジフェニルシリル) - 4- (p-トルエンスルホンニルオキシ

メチル) - β -D-リボフラノシド (16) の合成
化合物 15 (645mg, 1.03 mmol) の THF- H_2O [11ml, 8:3 (v/v)] 溶液に室温でトリフロロ酢酸 (14ml) を加え、室温で 20 分攪拌した。溶媒を減圧留去し、得られた粗成績体をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (hexane : AcOEt = 5:1) により精製し、無色油状物質 16 (464mg, 0.79 mmol, 77%) を得た。

【0060】 $[\alpha]_D^{17}$ -35.8° (c = 1.90, CHCl_3) IR_{ν} (KBr): 3499, 3051, 2931, 2840, 1594, 1468, 1362, 1109 cm^{-1} .

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ : 1.02 (9H, s), 2.42 (3H, s), 3.16 (3H, s), 3.54, 3.70 (2H, AB, J = 10 Hz), 3.97 (1H, d, J = 5 Hz), 4.18 (1H, d, J = 5 Hz), 4.26, 4.39 (2H, AB, J = 10 Hz), 4.73 (1H, s), 7.30 (2H, d, J = 8 Hz), 7.36-7.44 (6H, m), 7.59-7.66 (4H, m), 7.78 (2H, d, J = 8 Hz).

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3) δ : 19.2, 21.6, 26.7, 55.2, 66.5, 69.6, 74.0, 75.2, 76.5, 84.8, 107.5, 127.7, 128.0, 129.8, 132.6, 132.7, 132.8, 135.5, 135.6, 144.9.

Anal. Calcd for $\text{C}_{30}\text{H}_{38}\text{SSiO}_5 \cdot 1/4 \text{H}_2\text{O}$: C, 60.94; H, 6.56. Found: C, 60.94; H, 6.43.

【0061】 (4) メチル = 5-O- (α -ブチルジフェニルシリル) - 2-O, 4-C-メチレン- β -D-リボフラノシド (17) 及びメチル = 5-O- (α -ブチルジフェニルシリル) - 3-O, 4-C-メチレン- β -D-リボフラノシド (18) の合成

窒素気流下、化合物 16 (194mg, 0.33 mmol) の無水 THF 溶液 (4ml) に室温で NaHMDS (3.30 mmol) の benzene 懸濁液 (1.6ml) を加え、室温で 1 時間攪拌した。反応溶液に飽和重曹水を加えた後、反応溶媒を留去し、 AcOEt で 3 回抽出した。有機層を飽和食塩水で 1 回洗浄後、無水 Na_2SO_4 にて乾燥した。溶媒を減圧留去し、得られた粗成績体をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (ヘキサン : AcOEt = 5:1) により精製し、無色油状物質 17 (48mg, 0.16 mmol, 35%) 及び無色油状物質 18 (59mg, 0.142 mmol, 43%) を得た。

【0062】 化合物 17 : IR_{ν} (KBr): 3438, 3064, 1103, 1036 cm^{-1} .

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ : 1.08 (9H, s), 2.04 (1H, br s), 3.39 (3H, s), 3.65, 3.98 (2H, AB, J = 8 Hz), 3.95, 4.02 (2H, AB, J = 12 Hz), 4.02 (1H, s), 4.30 (1H, s), 4.79 (1H, s), 7.38-7.46 (6H, m), 7.65-7.69 (4H, m).

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3) δ : 19.2, 26.7, 55.0, 60.7, 71.2, 73.1, 79.9, 85.5, 104.3, 127.8, 129.9, 130.0, 132.9, 135.6, 135.7.

Anal. Calcd for $\text{C}_{23}\text{H}_{30}\text{O}_5\text{Si} \cdot 1/4 \text{H}_2\text{O}$: C, 65.68; H, 7.34. Found: C, 65.98; H, 7.23. 化合物 18 : IR_{ν} (KBr): 3456, 3058, 2938, 2852, 1467, 1108 cm^{-1} .

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ : 1.10 (9H, s), 3.26 (3H, s), 3.71 (2H, s), 4.02 (1H, d, J = 6 Hz), 4.35, 4.95 (2H, d, J

=7Hz), 5.01 (1H, s), 5.11 (1H, d, J=6Hz), 7.38-7.44 (6H, m), 7.66 (4H, d, J=7Hz).

^{13}C -NMR (CDCl₃) δ : 19.3, 26.8, 55.4, 63.7, 75.1, 77.9, 84.5, 86.3, 111.9, 127.8, 128.0, 129.9, 132.9, 133.0, 135.6, 135.8, 135.9.

Anal. Calcd for C₂₃H₃₀O₅Si·1/4 H₂O:C, 65.91; H, 7.34. Found: C, 66.07; H, 7.14.

【0063】(5) メチル=3-O-アセチル-5-O-(*t*-ブチルジフェニルシリル)-2-O-, 4-C-メチレン- β -D-リボフラノシド (19) の合成

窒素気流下、化合物 17 (704mg, 1.70mmol) の無水ピリジン溶液 (10ml) に室温で無水酢酸 (0.38ml, 4.08mmol)、4-ジメチルアミノピリジン (21mg, 0.170mmol) を加え、室温で 3 時間撹拌した。反応溶液に飽和重曹水を加えた後、AcOEt で 3 回抽出した。有機層を飽和食塩水で 1 回洗浄後、無水 Na₂SO₄ にて乾燥した。溶媒を減圧留去し、得られた粗成績体をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (ヘキサン: AcOEt=7:1) により精製し、無色油状物質 19 (665mg, 1.46mmol, 86%) を得た。

$[\alpha]_D^{17-34}$: 3.3° (c=0.93, CHCl₃) IR ν (KBr): 3438, 3064, 2934, 1749, 1468, 1103, 1036cm⁻¹.

^1H -NMR (CDCl₃) δ : 0.99 (9H, s), 1.97 (3H, s), 3.34 (3H, s), 3.69, 3.86 (2H, AB, J=8Hz), 3.86 (2H, s), 4.17 (1H, s), 4.77 (1H, s), 5.06 (1H, s), 7.28-7.39 (6H, m), 7.58-7.63 (4H, m).

^{13}C -NMR (CDCl₃) δ : 19.3, 20.9, 26.7, 55.0, 60.3, 72.0, 73.6, 78.3, 85.3, 104.4, 127.7, 129.8, 133.0, 135.6, 169.8.

Anal. Calcd for C₂₅H₃₂O₆Si·1/4 H₂O:C, 65.12; H, 7.10. Found: C, 65.27; H, 7.00.

【0064】(6) 5'-O-(*t*-ブチルジフェニルシリル)-2'-O-, 4'-C-メチレン-5-メチルウリジン (20) の合成

窒素気流下、化合物 19 (109.2g, 0.239mmol) の無水 C₆H₅CN 溶液 (2ml) に室温で O, O'-ビストリメチルシリルチミン (154mg, 0.598mmol) を加えた後、氷冷下でトリメチルシリルトリフルオロメタンスルホネート (0.82ml, 8.74mmol) の 1, 1-ジクロロエタン (0.31ml) 溶液を加え、室温で 18 時間撹拌した。反応溶液を CH₂Cl₂ で希釈し、飽和重曹水を加えた後、AcOEt で 3 回抽出した。有機層を飽和食塩水で 1 回洗浄後、無水 Na₂SO₄ にて乾燥した。溶媒を減圧留去し、得られた粗成績体をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (ヘキサン: AcOEt=3:1) により精製し、無色油状物質 20 (87.7mg, 0.173mmol, 70%) を得た。

【0065】IR ν (KBr): 3048, 2935, 2852, 1749, 1466, 1369, 1234, 1108, 1040cm⁻¹.

^1H -NMR (CDCl₃) δ : 1.06 (9H, s), 1.94 (3H, s), 2.98 (1H, br s), 3.63, 4.00 (2H, AB, J=10Hz), 3.72 (1H, d, J=7Hz), 3.82-3.84 (2H, m), 4.30 (1H, s), 5.25 (1H,

s), 7.40-7.46 (6H, m), 7.60 (4H, d, J=6Hz), 7.66 (1H, s), 9.68 (1H, br s).

【0066】[実施例 3] ヌクレオシド類縁体の合成 (別法)

(1) 3-O-ベンジル-5-O-*t*-ブチルジフェニルシリル-4-(ヒドロキシメチル)-1, 2-O-イソプロピリデン- α -D-エリスロペンチフラノース

(32) の合成

窒素気流下、氷冷下で文献 5) に従って調整した化合物 31 (2.50 g, 8.08 mmol) の塩化メチレン溶液 (50 ml) に、トリエチルアミン (3.71 ml, 26.6 mmol)、*t*-ブチルジフェニルシリルクロリド (6.94 ml, 26.7 mmol) を加え、室温で 10.5 時間撹拌した。反応溶液に飽和重曹水を加えた後、酢酸エチルで抽出した。有機層を飽和食塩水で洗浄後、硫酸ナトリウムで乾燥した。溶媒を減圧留去し、得られた粗成績体をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (AcOEt-ヘキサン, 1:4 \rightarrow 1:3) により精製し、白色固体 (32) (2.97 g, 5.41 mmol, 67%) を得た。

【0067】mp. 98-99°C (ヘキサン). $[\alpha]_D^{20}$: +54.8° (c=1.12, アセトン). IR ν max (KBr): 3553, 2936, 1463, 1379, 1107 cm⁻¹. ^1H -NMR (CDCl₃) δ : 1.13 (9H, s), 1.50 (3H, s), 1.78 (3H, s), 2.56 (1H, t, J=7 Hz), 3.82, 3.92 (2H, AB, J=11 Hz), 3.94 (2H, t, J=6 Hz), 4.57 (1H, d, J=5 Hz), 4.64, 4.95 (2H, AB, J=12 Hz), 4.83 (1H, dd, J=4, 5 Hz), 5.95 (1H, d, J=4 Hz), 7.44-7.55 (11H, m), 7.72-7.78 (4H, m). ^{13}C -NMR (CDCl₃) δ : 19.2, 26.2, 26.5, 26.8, 63.2, 65.4, 72.5, 77.9, 79.1, 87.4, 104.4, 113.7, 127.6, 127.7, 128.0, 128.5, 129.5, 129.7, 132.9, 133.1, 134.7, 135.5, 137.2.

Anal. Calcd for C₃₂H₄₀O₆Si: C, 70.04; H, 7.38. Found: C, 70.19; H, 7.35.

【0068】(2) 3-O-ベンジル-5-O-(*t*-ブチルジフェニルシリル)-4-(*p*-トルエンスルホニルオキシメチル)-1, 2- α -D-エリスロペンチフラノース (33) の合成

窒素気流下、氷冷下で 32 (250 mg, 0.456 mmol) の塩化メチレン溶液に、トリエチルアミン (395 μ l, 2.83 mmol)、*p*-トルエンスルホンクロリド (139.2 mg, 0.730 mmol) 及び 4-ジメチルアミノピリジン (8.92 mg, 0.0730 mmol) を加え、室温で 15.5 時間撹拌した。反応溶液に飽和重曹水を加えた後、酢酸エチルで抽出した。有機層を飽和食塩水で洗浄後、硫酸ナトリウムにて乾燥した。溶媒を減圧留去し、得られた粗成績体をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (AcOEt-ヘキサン, 1:6) により精製し、淡黄色油状物質 (33) (310.6 mg, 0.442 mmol, 97%) を得た。

【0069】 $[\alpha]_D^{20}$: +16.0° (c=0.44, アセトン). IR ν max (KBr): 2935, 1595, 1462, 1363, 117

4, 1106 cm^{-1} . $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ : 1.08 (9H, s), 1.40 (3H, s), 1.46 (3H, s), 2.48 (3H, s), 3.68, 3.83 (2H, AB, $J = 11$ Hz), 4.45 (2H, dd, $J = 4, 5$ Hz), 4.64, 4.81 (2H, AB, $J = 12$ Hz), 4.68 (1H, dd, $J = 4, 5$ Hz), 5.81 (1H, d, $J = 4$ Hz), 7.32 (2H, d, $J = 8$ Hz), 7.42-7.72 (15H, m), 7.82, (2H, d, $J = 8$ Hz), 7.66 (4H, m), 7.72 (2H, d, $J = 8$ Hz). $^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3) δ_c : 19.1, 21.5, 26.1, 26.4, 26.7, 64.4, 70.0, 72.5, 78.1, 78.9, 85.4, 104.2, 113.6, 127.3, 127.7, 127.9, 128.0, 128.4, 129.6, 129.7, 129.8, 132.7, 132.8, 135.5, 137.2, 144.4. MS (EI) m/z : 646 ($\text{M}^+ - \text{t-Bu}$). High-MS (EI): Calcd for $\text{C}_{35}\text{H}_{37}\text{O}_8\text{SSi}$ ($\text{M}^+ - \text{t-Bu}$): 645.1978. Found: 645.1969.

【0070】(3) 1, 2-ジ-*o*-アセチル-3-*o*-ベンジル-5-*o*-*tert*-ブチルジフェニルシリル-4-(*p*-トルエンシルホニルオキシメチル)- α -および- β -D-リボフラノース(34)の合成
窒素気流下、34 (3.70 g, 5.27 mmol) の酢酸溶液 (56 ml) に無水酢酸 (6.0 ml, 63.6 mmol) 及び濃硫酸 (56 μl , 1.10 μmol) を加え、室温で 2 時間攪拌した。反応溶液を氷水 (300 ml) にあけて 30 分間攪拌した後、飽和食塩水を加え、酢酸エチルで抽出した後、有機層を硫酸マグネシウムにて乾燥した。溶媒を留去して得られた粗成績体をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (AcOEt-ヘキサン, 2:1) により精製し、黄色油状物質 (34) (3.36 g, 4.53 mmol, 86%) を α : β = 1:4 の混合物として得た。

【0071】IR ν_{max} (KBr): 2934, 2863, 1751, 1365, 1217, 1106 cm^{-1} . $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) [β 体] δ : 1.02 (9H, s), 1.77 (3H, s), 1.98 (3H, s), 2.39 (3H, s), 3.61, 3.76 (2H, AB, $J = 11$ Hz), 4.21-4.58 (5H, m), 5.26 (1H, d, $J = 5$ Hz), 5.94 (1H, s), 7.15-7.59 (13H, m), 7.58-7.66 (4H, m), 7.72 (2H, d, $J = 8$ Hz). [α 体] δ : 1.02 (9H, s), 1.98 (3H, s), 2.36 (3H, s), 3.48, 3.58 (2H, AB, $J = 11$ Hz), 4.21-4.58 (5H, m), 5.12 (1H, dd, $J = 5, 6$ Hz), 6.33 (1H, d, $J = 5$ Hz), 7.15-7.59 (13H, m), 7.58-7.66 (4H, m), 7.72 (2H, d, $J = 8$ Hz). $^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3) δ_c : 14.2, 19.3, 20.5, 20.8, 21.6, 26.7, 26.8, 60.3, 64.8, 69.1, 73.6, 74.1, 78.6, 85.3, 97.4, 127.4, 127.6, 127.7, 127.8, 127.9, 128.0, 128.2, 128.3, 128.4, 129.5, 129.6, 1289.8, 129.9, 132.4, 132.8, 132.9, 135.4, 135.5, 135.6, 136.9, 144.5, 168.7, 169.4. High-MS (FAB): Calcd for $\text{C}_{40}\text{H}_{46}\text{N}_2\text{O}_{10}\text{SSiNa}$ ($\text{M}^+ + \text{Na}$): 769.2479. Found: 769.2484.

【0072】(4) 2'-*o*-アセチル-3'-*o*-ベンジル-5'-*o*-*tert*-ブチルジフェニルシリル-4'-*p*-トルエンシルホニルオキシメチル-5-メチルウリジン(35)の合成
窒素気流下、氷冷下で 34 (1.88g, 2.52 mmol) の 1,2-

ジクロロエタン溶液 (26 ml) に 2TMS-T (1.04 g, 4.03 mmol) 及びトリメチルシリルトリフルオロメタンスルホナート (730 μl , 4.03 mmol) を加え、室温で 17 時間攪拌した。反応溶液に飽和重曹水を加え、セライト濾過した後、母液をクロロホルムで抽出した。有機層を飽和食塩水で洗浄後、硫酸ナトリウムにて乾燥した。溶媒を減圧留去して得られた粗成績体をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (AcOEt-ヘキサン, 2:3) により精製し、白色粉末 (35) (2.00 g, 2.44 mmol, 97%) を得た。

【0073】mp. 70 - 71.5 $^{\circ}\text{C}$. $[\alpha]_D^{24} + 4.58^{\circ}$ ($c = 1.25$, アセトン). IR ν_{max} (KBr): 3059, 2934, 1694, 1465, 1368, 704 cm^{-1} . $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ : 1.18 (9H, s), 1.63 (3H, d, $J = 1$ Hz), 2.10 (3H, s), 2.42 (3H, s), 3.73, 3.86 (2H, AB, $J = 11$ Hz), 4.12, 4.20 (2H, AB, $J = 11$ Hz), 4.44, 4.57 (2H, AB, $J = 11$ Hz), 4.45 (1H, d, $J = 6$ Hz), 5.38 (1H, t, $J = 6$ Hz), 6.02 (1H, d, $J = 6$ Hz), 7.21-7.60 (13H, m), 7.62-7.69 (7H, m), 8.91 (1H, br s). $^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3) δ_c : 11.9, 19.3, 20.6, 21.6, 27.0, 65.3, 68.6, 74.1, 74.8, 77.2, 77.3, 86.0, 86.4, 111.6, 127.9, 128.0, 128.2, 128.5, 129.7, 130.1, 130.2, 131.8, 132.3, 132.5, 135.3, 135.5, 135.6, 136.8, 144.9, 150.2, 163.4, 170.2. MS (FAB) m/z : 813 ($\text{M}^+ + \text{H}$). Anal. Calcd for $\text{C}_{43}\text{H}_{48}\text{N}_2\text{O}_{10}\text{SSi} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$: C, 60.83; H, 6.17; N, 3.30. Found: C, 60.55; H, 5.78; N, 3.22.

【0074】(5) 3'-*o*-ベンジル-5'-*o*-*tert*-ブチルジフェニルシリル-4'-*p*-トルエンシルホニルオキシメチル-5-メチルウリジン(36)の合成
氷冷下、35 (250 mg, 0.308 mmol) のメチルアルコール溶液 (4 ml) に炭酸カリウム (12.75 mg, 0.0923 mmol) 及び水 (0.5 ml) を加え、室温で 22 時間攪拌した。氷冷下、反応溶液に酢酸を加えて中和した後、溶媒を減圧留去した。残渣に水を加えた後、酢酸エチルで抽出した。有機層を飽和食塩水で洗浄した後、硫酸ナトリウムで乾燥した。溶媒を減圧留去した後、得られた粗成績体をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (AcOEt-ヘキサン, 3:2) により精製し、白色粉末 (36) (216.7 mg, 0.283 mmol, 92%) を得た。

【0075】mp. 74 - 77 $^{\circ}\text{C}$. $[\alpha]_D^{23} + 5.15^{\circ}$ ($c = 1.23$, CHCl_3). IR ν_{max} (KBr): 3048, 2934, 1695, 1363, 1181, 1108, 977, 819, 704 cm^{-1} . $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ : 1.05 (9H, s), 1.65 (3H, d, $J = 1$ Hz), 2.39 (3H, s), 3.04 (1H, br d, $J = 9$ Hz), 3.72 (2H, s), 4.17 (2H, s), 4.18 (1H, d, $J = 5$ Hz), 4.24-4.32 (1H, m), 4.54, 4.62 (2H, AB, $J = 11$ Hz), 5.62 (1H, d, $J = 6$ Hz), 7.19-7.69 (20H, m), 8.46 (1H, br s). $^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3) δ_c : 12.1, 19.4, 26.9, 58.8, 72.0, 72.2, 75.8, 76.7, 87.4, 88.8, 110.4, 127.7, 12.79, 128.1, 128.2, 128.5, 128.7, 129.8, 130.0, 130.1, 13

2.2, 134.3, 135.3, 135.5, 136.8, 149.8, 163.9. MS (FAB) m/z : 771 (M^+H).

Anal. Calcd for $C_{41}H_{46}N_2O_9SSi$: C, 63.41; H, 6.16; N, 3.51; S, 3.95. Found: C, 63.87; H, 6.01; N, 3.63; S, 4.16.

【0076】(6) 3'-O-ベンジル-5'-O-テブチルジフェニルシリル-2'-O-, 4'-C-メチレン-5-メチルウリジン(37)の合成

窒素気流下、氷冷下で36(1.86 g, 2.42 mmol)のテトラヒドロフラン溶液(30 ml)にナトリウムビス(トリメチルシリル)アミド(1.0 M in THF, 8.47 ml, 8.47 mmol)を加え、室温で1時間攪拌した。反応溶液に飽和重曹水(14 ml)を加えた後、溶媒を減圧留去した。残渣に水を加え、クロロホルムで抽出した。有機層を飽和食塩水で洗浄した後、硫酸ナトリウムにて乾燥した。溶媒を減圧留去し、得られた粗成績体をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(AcOEt-ヘキサン, 2:3)により精製し、白色粉末(37)(1.42 g, 2.37 mmol, 98%)を得た。

【0077】mp. 70.5-72 °C. $[\alpha]_D^{22} + 52.47^\circ$ ($c = 1.025$, アセトン). IR ν_{max} (KBr): 2936, 1694, 1465, 1275, 1106, 1055, 809, 704 cm^{-1} . 1H -NMR (CDCl₃) δ : 1.21 (9H, s), 1.76 (3H, s), 3.88, 4.07 (2H, AB, $J = 8$ Hz), 4.07, 4.15 (2H, AB, $J = 11$ Hz), 4.16 (1H, s), 4.66, 4.80 (2H, AB, $J = 11$ Hz), 4.76 (1H, s), 7.34-7.79 (16H, m), 10.0 (1H, br s). MS (FAB) m/z : 599 (M^+H).

Anal. Calcd for $C_{34}H_{38}N_2O_6Si \cdot 2H_2O$: C, 64.33; H, 6.03; N, 4.41. Found: C, 64.58; H, 6.15; N, 4.28.

【0078】(7) 3'-O-ベンジル-2'-O-, 4'-C-メチレン-5-メチルウリジン(38)の合成

窒素気流下、37(188.7 mg, 0.316 mmol)のテトラヒドロフラン溶液(1 ml)に、テトラブチルアンモニウムフルオリド(1.0 M in THF, 379 μ l, 0.379 mmol)を加え、室温で2.5時間攪拌した。反応溶液を減圧留去して得られた粗成績体をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(AcOEt-ヘキサン, 1:1→1:0)により精製し、白色粉末(38)(94.6 mg, 0.262 mmol, 83%)を得た。

【0079】IR ν_{max} (KBr): 3424, 3183, 3063, 2950, 1691, 1463, 1273, 1057, 734 cm^{-1} . 1H -NMR (CDCl₃) δ : 1.90 (3H, d, $J = 1$ Hz), 3.83, 4.05 (2H, AB, $J = 8$ Hz), 3.93, 4.02 (2H, AB, $J = 12$ Hz), 3.94 (1H, s), 4.53 (1H, s), 4.56, 4.58 (2H, AB, $J = 12$ Hz), 5.65 (1H, s), 7.32 (5H, s), 7.44 (1H, d, $J = 1$ Hz). High-MS (EI): Calcd for $C_{18}H_{20}NO_6$ (M^+): 360.1321. Found: 360.1312.

(8) 2'-O-, 4'-C-メチレン-5-メチルウリジン(39a)の合成化合物38(86.5 mg, 0.240 mmol)のメチルアルコール溶液(4 ml)に20%Pd(OH)₂-C

(86.5 mg)を加え、水素気流下常圧にて14.5時間攪拌した。反応溶液を濾過した後、溶媒を減圧留去して無色結晶(39)(62.5 mg, 0.230 mmol, 96%)を得た。

【0080】mp. 194-195 °C. $[\alpha]_D^{20} + 53.7^\circ$ ($c = 1.02$, EtOH). IR ν_{max} (KBr): 3323, 3163, 3027, 2889, 2826, 1689, 1471, 1276, 1057 cm^{-1} . 1H -NMR (CD₃OD) δ : 1.89 (3H, q, $J = 1$ Hz), 3.74, 3.95 (2H, AB, $J = 8$ Hz), 3.90 (1H, s), 4.07 (1H, s), 4.26 (1H, s), 5.53 (1H, s), 7.74 (1H, d, $J = 1$ Hz). ^{13}C -NMR (CD₃OD) δ : 12.6, 57.6, 70.3, 72.4, 80.8, 88.3, 90.4, 110.7, 136.8, 151.8, 166.5.

【0081】[実施例4]

(1) 2'-O-アセチル-3'-O-ベンジル-5'-O-テブチルジフェニルシリル-4'-p-トルエンスルホニルオキシメチル-N⁶-ベンゾイルアデノシン(40)の合成

文献6)(H. Vorbruggen, K. Krolkiewicz and B. Bennua, Chem., Ber., 114, 1234-1255 (1981))に従って調整した2TMS \cdot AB²(128.7 mg, 0.336 mmol)に窒素気流下、室温で34(250 mg, 0.336 mmol)の1,2-ジクロロエタン溶液(5.0 ml)及びトリメチルシリルトリフルオロメタンスルホナート(6.7 μ l, 0.0336 mmol)を加え、26時間加熱還流した。反応溶液に飽和重曹水を加えた後、塩化メチレンで3回抽出した。有機層を飽和食塩水で洗浄後、硫酸ナトリウムにて乾燥した。溶媒を減圧留去し、得られた粗成績体をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(CHCl₃-MeOH, 30:1)により精製し、白色粉末(40)(234.5 mg, 0.253 mmol, 75%)を得た。

【0082】mp. 77-78 °C (AcOEt / ヘキサン). $[\alpha]_D^{24} - 13.2^\circ$ ($c = 1.00$, CHCl₃). IR ν_{max} (KBr): 3058, 2934, 1749, 1703, 1606, 1105 cm^{-1} . 1H -NMR (CDCl₃) δ : 0.99 (9H, s), 2.04 (3H, s), 2.38 (3H, s), 3.74, 3.85 (2H, AB, $J = 11$ Hz), 4.31, 4.43 (2H, AB, $J = 11$ Hz), 4.52, 4.58 (2H, AB, $J = 11$ Hz), 4.81 (1H, d, $J = 6$ Hz), 5.94 (1H, d, $J = 6$ Hz), 6.04 (1H, d, $J = 5$ Hz), 7.18-7.61 (20H, m), 7.69 (2H, d, $J = 8$ Hz), 7.99 (1H, s), 8.01 (2H, d, $J = 7$ Hz), 8.56 (1H, s), 8.99 (1H, br s). ^{13}C -NMR (CDCl₃) δ : 19.1, 20.5, 21.5, 26.7, 64.1, 68.4, 74.0, 74.6, 77.9, 86.57, 86.64, 123.4, 127.7, 127.8, 127.9, 128.1, 128.5, 128.8, 129.6, 129.9, 132.0, 132.3, 132.6, 132.7, 133.5, 135.4, 135.5, 136.8, 142.0, 144.7, 149.6, 151.2, 152.6, 164.5, 169.8. MS (FAB) m/z : 926 (M^+H).

【0083】(2) 3'-O-ベンジル-5'-O-テブチルジフェニルシリル-4'-p-トルエンスルホニルオキシメチル-N⁶-ベンゾイルアデノシン(41)の合成

化合物40(167.9 mg, 0.182 mmol)のメチルアルコ-

ル溶液 (3.0 ml) に室温で炭酸カリウム (15.0 mg, 0.109 mmol) を加えた後、室温で 15 分攪拌した。反応溶液に濃塩酸を加えて溶液を中和した後、塩化メチレンで 3 回抽出した。有機層を飽和食塩水で洗浄後、硫酸ナトリウムにて乾燥した。溶媒を減圧留去し、得られた粗成績体をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (CHCl₃-MeOH, 30:1) により精製し、白色粉末 (41) (140.5 mg, 0.160 mmol, 88 %) を得た。

【0084】 mp. 82-83 °C (AcOEt-ヘキサン). $[\alpha]_D^{25} - 6.02^\circ$ (c = 0.96, CHCl₃). IR ν_{\max} (KBr) : 3066, 3066, 2935, 2859, 1701, 1611 cm⁻¹. ¹H-NMR (CDCl₃) δ : 0.98 (9H, s), 2.37 (3H, s), 3.76 (2H, s), 4.39, 4.45 (1H, AB, J = 11 Hz), 4.54 (1H, d, J = 6 Hz), 4.67, 4.76 (2H, AB, J = 11 Hz), 4.85 (1H, dd, J = 5, 6 Hz), 5.79 (1H, d, J = 5 Hz), 7.20 - 7.58 (21H, m), 7.73 (2H, d, J = 8 Hz), 7.80 (1H, s), 7.96 (2H, d, J = 8 Hz), 8.49 (1H, s), 9.18 (1H, br s). ¹³C-NMR (CDCl₃) δ c: 19.1, 21.6, 26.8, 64.4, 68.9, 74.1, 74.6, 79.2, 86.8, 89.8, 123.1, 127.7, 127.8, 128.0, 128.2, 128.4, 128.6, 128.8, 129.7, 130.0, 132.1, 132.5, 132.6, 132.8, 133.4, 135.4, 135.5, 136.8, 142.1, 144.8, 149.4, 152.3, 164.5.

【0085】 (3) 3'-O-ベンジル-5'-O-tert-ブチルジフェニルシリル-2'-O-, 4'-C-メチレン-N⁶-ベンジルアデノシン (42) の合成
窒素気流下、41 (210.5 mg, 0.238 mmol) のテトラヒドロフラン溶液 (8.0 ml) に室温でナトリウムビス (トリメチルシリル) アミド (1.0 M in THF, 0.58 ml, 0.572 mmol) を加えた後、室温で 3 時間攪拌した。反応溶液に飽和重曹水を加えた後、塩化メチレンで 3 回抽出した。有機層を飽和食塩水で洗浄後、硫酸ナトリウムにて乾燥した。溶媒を減圧留去し、得られた粗成績体をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (CHCl₃-MeOH, 30:1) により精製し、白色粉末 (42) (169.5 mg, 0.238 mmol, quant.) を得た。

【0086】 mp. 80-81 °C. IR ν_{\max} (KBr) : 3259, 3064, 2932, 2858, 1703, 1607 cm⁻¹. ¹H-NMR (CDCl₃) δ : 1.07 (9H, s), 3.95, 4.10 (2H, AB, J = 8 Hz), 4.02 (2H, d, J = 8 Hz), 4.56, 4.64 (2H, AB, J = 12 Hz), 4.26 (1H, s), 4.86 (1H, s), 6.14 (1H, s), 7.26 - 7.70 (18H, m), 8.04 (2H, d, J = 7 Hz), 8.22 (1H, s), 8.78 (1H, s), 9.18 (1H, br s). ¹³C-NMR (CDCl₃) δ c: 19.2, 26.5, 26.8, 29.7, 59.2, 72.4, 72.6, 76.5, 76.8, 86.7, 88.6, 123.4, 127.7, 127.8, 127.9, 128.1, 128.4, 128.8, 129.5, 130.0, 132.4, 132.5, 132.8, 133.5, 134.8, 135.2, 135.5, 135.6, 136.8, 140.4, 152.7.

【0087】 (4) 3'-O-ベンジル-2'-O-, 4'-C-メチレン-N⁶-ベンゾイルアデノシン (43) の合成

化合物 42 (173.6 mg, 0.244 mmol) のテトラヒドロフラン溶液 (7.0 ml) に室温でテトラブチルアンモニウムフルオリド (1.0 M in THF, 1.0 ml, 1.0 mmol) を加え、室温で 25 分攪拌した。反応溶液を減圧留去して得られた粗成績体をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (CHCl₃-MeOH, 15:1) により精製し、白色粉末 (43) (115.4 mg, 0.244 mmol, quant.) を得た。

【0088】 mp. 154-155 °C (Et₂O). IR ν_{\max} (KBr) : 3339, 2944, 1701, 1611 cm⁻¹. ¹H-NMR (CDCl₃) δ : 3.91, 4.13 (2H, AB, J = 8 Hz), 3.93, 4.01 (2H, AB, J = 12 Hz), 4.38 (1H, s), 4.64 (1H, s), 4.85 (1H, s), 6.08 (1H, s), 7.29 (1H, s), 7.51 (2H, d, J = 8 Hz), 7.58 (1H, d, J = 7 Hz), 8.05 (2H, d, J = 7 Hz), 8.14 (1H, s), 8.75 (1H, s), 9.50 (1H, br s). ¹³C-NMR (CDCl₃) δ c: 57.1, 72.4, 77.0, 77.1, 86.9, 88.6, 122.9, 127.6, 128.0, 128.1, 128.4, 128.7, 132.8, 133.5, 136.9, 140.5, 149.8, 150.5, 152.8, 165.0.

【0089】 [実施例 5]

(1) 2'-O-アセチル-3'-O-ベンジル-5'-O-tert-ブチルジフェニルシリル-4'-p-トルエンスルホニルオキシメチル-N²-イソブチルグアノシン (44) の合成

前記の文献 6) に従って調整した 3TMS·GⁱBu (146.8 mg, 0.336 mmol) に窒素気流下、室温で 4 (250 mg, 0.336 mmol) の 1, 2-ジクロロエタン溶液 (5.0 ml) 及びトリメチルシリルトリフルオロメタンスルホナート (6.7 μ l, 0.0336 mmol) を加え、15 時間加熱還流した。反応溶液に飽和重曹水を加えた後、塩化メチレンで 3 回抽出した。有機層を飽和食塩水で洗浄後、硫酸ナトリウムにて乾燥した。溶媒を減圧留去し、得られた粗成績体をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (CHCl₃-MeOH, 30:1) により精製し、白色粉末 (44) (213.6 mg, 0.235 mmol, 70 %) を得た。

【0090】 mp. 96-97 °C (AcOEt-ヘキサン). $[\alpha]_D^{24} - 11.09^\circ$ (c = 0.97, CHCl₃). IR ν_{\max} (KBr) : 3152, 3065, 2934, 1746, 1681, 1606 cm⁻¹. ¹H-NMR (CDCl₃) δ : 0.96 (9H, s), 1.10 (3H, d, J = 9 Hz), 1.13 (3H, d, J = 9 Hz), 1.98 (3H, s), 2.36 (3H, s), 2.48 (1H, m), 3.65, 3.72 (2H, AB, J = 11 Hz), 4.23, 4.43 (2H, AB, J = 11 Hz), 4.47 (2H, s), 4.63 (1H, d, J = 6 Hz), 5.74 (1H, t, J = 6 Hz), 5.96 (1H, d, J = 6 Hz), 7.14 - 7.68 (20H, m), 9.15 (1H, s), 12.20 (1H, s). ¹³C-NMR (CDCl₃) δ c: 19.1, 19.3, 19.4, 20.8, 21.9, 27.0, 27.2, 36.5, 64.5, 68.9, 74.4, 74.9, 76.7, 86.1, 86.7, 122.0, 127.6, 127.7, 127.9, 128.1, 128.3, 128.4, 128.8, 130.1, 130.4, 132.3, 132.7, 132.9, 135.7, 135.8, 137.3, 137.8, 145.2, 147.8, 148.5, 156.2, 170.2, 178.8.

【0091】 (2) 3'-O-ベンジル-5'-O-tert-

ーブチルジフェニルシリル-4'-p-トルエンスルホ
ニルオキシメチル-N²-イソブチリルグアノシン (4
5) の合成

化合物 4 4 (137.0 mg, 0.151 mmol) のメチルアルコ
ール溶液 (3.0 ml) に室温で炭酸カリウム (15.8 mg, 0.1
13 mmol) を加えた後、室温で 45 分攪拌した。反応溶
液に濃塩酸を加えて溶液を中和した後、塩化メチレンで
3 回抽出した。有機層を飽和食塩水で洗浄後、硫酸ナ
トリウムにて乾燥した。溶媒を減圧留去し、得られた粗
成績体をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (CHCl₃-
MeOH, 30:1) により精製し、白色粉末 4 5 (83.4 mg, 0.
097 mmol, 64 %) を得た。

【0092】 mp. 102 - 103 °C (AcOEt-ヘキサン).
[α]_D²⁵ - 2.00 ° (c = 0.40, CHCl₃). IR ν_{max} (KBr)
: 3166, 2932, 1684, 1607 cm⁻¹. ¹H-NMR (CDCl₃) δ:
0.90 (9H, s), 1.09 (3H, d, J = 7 Hz), 1.13 (3H,
d, J = 7 Hz), 2.30 (1H, m), 2.37 (3H, s), 3.71, 3.
76 (2H, AB, J = 11 Hz), 4.32, 4.48 (2H, AB, J = 11
Hz), 4.35 (1H, d, J = 6 Hz), 4.63, 4.90 (2H, AB,
J = 12 Hz), 4.96 (1H, t, J = 6 Hz), 5.67 (1H, d, J
= 7 Hz), 7.17 - 7.71 (20H, m), 8.82 (1H, s), 12.05
(1H, br s). ¹³C-NMR (CDCl₃) δc: 18.7, 19.0, 21.6,
26.5, 36.2, 63.5, 69.1, 73.7, 74.3, 78.8, 86.2, 8
9.5, 127.7, 127.8, 128.0, 128.1, 128.5, 129.7, 130.
0, 132.0, 132.6, 132.7, 135.3, 135.4, 137.4, 138.
2, 144.8, 146.9, 155.5, 178.5.

【0093】 (3) 3'-O-ベンジル-5'-O-
ーブチルジフェニルシリル-2'-O-, 4'-C-メチ
レン-N²-イソブチリルグアノシン (4 6) の合成
窒素気流下、4 5 (92.1 mg, 0.102 mmol) のテトラヒド
ロフラン溶液 (3.0 ml) に室温でナトリウムビス (トリ
メチルシリル) アミド (1.0 M in THF, 0.31ml, 0.315
mmol) を加えた後、室温で 3 時間攪拌した。反応溶液
に飽和重曹水を加えた後、塩化メチレンで 3 回抽出し
た。有機層を飽和食塩水で洗浄後、硫酸ナトリウムにて
乾燥した。溶媒を減圧留去し、得られた粗成績体をシリ
カゲルカラムクロマトグラフィー (CHCl₃-MeOH, 25:1)
により精製し、白色粉末 (4 6) (31.4 mg, 0.160 mmo *

*1, 44 %) を得た。

【0094】 mp. 99 - 100 °C. IR ν_{max} (KBr) : 316
2, 3068, 2932, 1683, 1610 cm⁻¹. ¹H-NMR (CDCl₃) δ:
1.06 (9H, s), 1.25 (3H, d, J = 7 Hz), 1.27 (3H,
d, J = 7 Hz), 2.64 (1H, m), 3.83, 4.01 (2H, AB, J
= 8 Hz), 3.97 (2H, d, J = 7 Hz), 4.18 (1H, s), 4.5
1 (1H, s), 4.54 (2H, d, J = 2 Hz), 5.77 (1H, s),
7.17-7.42 (5H, m), 7.64 - 7.72 (10H, m), 7.84 (1H,
s), 9.03 (1H, s), 12.08 (1H, br s). ¹³C-NMR (CDC
l₃) δc: 18.9, 19.0, 19.1, 26.5, 26.7, 36.4, 59.1,
72.4, 72.5, 76.8, 77.5, 86.3, 88.3, 121.7, 127.6,
127.7, 127.8, 127.9, 128.1, 128.4, 129.6, 130.0,
132.36, 132.42, 134.8, 135.45, 135.54, 135.8, 136.
8, 146.8, 147.7, 155.4, 178.6.

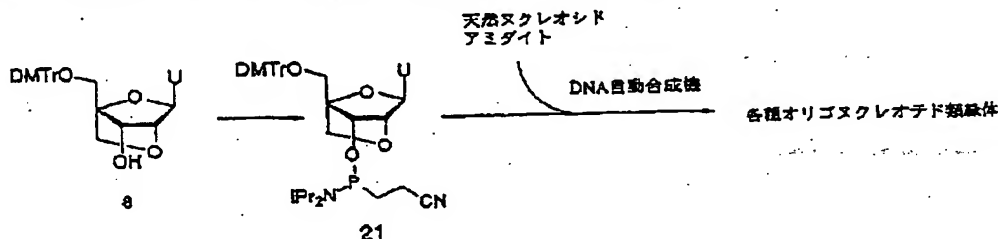
【0095】 (4) 3'-O-ベンジル-1-2'-O-
4'-C-メチレン-N²-イソブチリルグアノシン
(4 7) の合成

化合物 4 6 (41.3 mg, 0.060 mmol) のテトラヒドロフラ
ン溶液 (3.0 ml) に室温でテトラブチルアンモニウムフ
ルオリド (1.0 M in THF, 0.90 ml, 0.90 mmol) を加え
た後、室温で 1 時間攪拌した。反応溶液を減圧留去し
て得られた粗成績体をシリカゲルカラムクロマトグラフ
ィー (AcOH-EtOH, 20:1) により精製し、白色粉末 (4
7) (27.1 mg, 0.060 mmol, quant.) を得た。

【0096】 mp. 228 - 229 °C (Et₂O). [α]_D²⁵ + 3
2.90 ° (c = 0.875, CHCl₃). IR ν_{max} (KBr) : 3162, 2
934, 1683, 1608 cm⁻¹. ¹H-NMR (CDCl₃) δ: 1.24 (3
H, d, J = 7 Hz), 1.26 (3H, d, J = 7 Hz), 2.76 (1H,
m), 3.83, 4.03 (2H, AB, J = 8 Hz), 3.92, 4.02 (2H,
AB, J = 13 Hz), 4.33 (1H, s), 4.55 (1H, s), 4.62 (2
H, s), 5.80 (1H, s), 7.25 (5H, s), 7.91 (1H, s),
9.85 (1H, s), 12.05 (1H, s). ¹³C-NMR (CDCl₃) δc:
19.19, 19.25, 36.4, 57.4, 72.5, 77.0, 77.5, 86.5, 8
8.8, 121.0, 127.8, 128.1, 128.2, 128.3, 128.4, 12
8.6, 137.1, 137.5, 147.5, 148.2, 155.7, 179.9.

【0097】 【実施例 6】 オリゴヌクレオチド類縁体の
合成

【化 1 3】



【化 1 4】

5'-GCGXTTTTGGCT-3' (XT5)
 5'-GCGTTXTTGGCT-3' (T2XT3)
 5'-GCGTTTXXTGGCT-3' (T3XT2)
 5'-GCGTTTXXGCT-3' (T5X)
 5'-GCGXXTTTGGCT-3' (X2T4)
 5'-GCGTTXXTGGCT-3' (T2X2T2)
 5'-GCGTTTXXGCT-3' (T4X2)
 5'-GCGXXXXXXGCT-3' (X6)
 5'-GTTTTTTTXXC-3' (X2)

【0098】(1) 3'-O-[2-シアノエトキシ(ジイソプロピルアミノ)ホスフィノ]-5'-O-(4,4'-ジメトキシトリチル)-2'-O, 4'-メタノウリジン(21)の合成

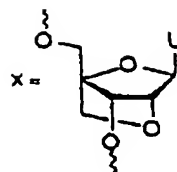
化合物8(200 mg, 0.31 mmol)、ジイソプロピルアンモニウムテトラゾリド(39.6 mg, 0.23 mmol)を無水CH₃CNで3回共沸した後、無水CH₃CN-無水THF溶液(3:1, 4 ml)とし、窒素気流下2-シアノエチルN,N,N',N'-テトライソプロピルホスホロジアミダイト(0.12 ml, 0.37 mmol)を加え、室温で90分間撹拌した。溶媒を減圧留去し、得られた粗生成物をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(AcOEt:ヘキサン:Et₃N=75:25:1)により精製後、AcOEt-ヘキサンにて再沈澱し、アミダイト体21(181 mg, 0.25 mmol, 81%)を得た。*20

合成サイクル(0.2 μmol scale)

- 1) detritylation 1% CCl₃COOH in CH₂ClCH₂Cl, 6 sec
- 2) coupling 0.1 M phosphoramidite (25 equiv.),
0.5 M 1H-tetrazole (500 equiv.) in MeCN, 2 min
- 3) capping 3% 4-(dimethylamino)pyridine, 10% Ac₂O,
in MeCN, 18 sec
- 4) oxidation 0.01 M I₂ in 2,4,6-collidine/H₂O/MeCN(1:5:11),
6 sec

【0102】合成後は、常法に従って、濃アンモニア水処理によりオリゴマーを支持体から切り出すとともに、リン原子上の保護基シアノエチル基をはずし、さらにはアデニン、グアニン、シトシンの保護基をはずした。

【0103】得られた5'-O-DMTr化されたオリゴヌクレオチド類縁体は、逆相カラムクロマト(Millipore



*【0099】mp71-74 °C (AcOEt-ヘキサン). ³¹P-NMR (CDCl₃): δ 149.6, 149.5, 149.4, 149.3, 149.2.

【0100】(2) オリゴヌクレオチド類縁体の一般合成 オリゴマーの合成は Pharmacia社製DNA合成装置 Gene Assembler Plusにより0.2 μmolスケールで行った。溶媒、試薬、ホスホロアミダイトの濃度は天然DNA合成の場合と同じである。3'-水酸基がCPG支持体に結合した5'-O-DMTr-チミジン(0.2 μmol)のDMTr基をトリクロロ酢酸によって脱保護し、その5'-水酸基に天然DNA合成用の4種の核酸塩基からなるアミダイトおよび化合物21を用いて縮合反応を繰り返して、それぞれの配列のオリゴヌクレオチド類縁体を合成した。合成サイクルは下記の通りである。

【0101】

※ore, Oligo-Pak™ SP) 上でトリフルオロ酢酸5 mlによりDMTr基をはずし、引き続き精製を行い、目的のオリゴヌクレオチド類縁体を得た。

【0104】本一般合成法に従って、以下のオリゴヌクレオチド類縁体を合成した。

- (2) 5'-GCGXTTTTGGCT-3' (XT5)
収量 0.06 μmol (30% yield)
- (3) 5'-GCGTTXTTGGCT-3' (T2XT3)
収量 0.05 μmol (25% yield)
- (4) 5'-GCGTTTXXTGGCT-3' (T3XT2)
収量 0.03 μmol (15% yield)
- (5) 5'-GCGTTTTTXXGCT-3' (T5X)
収量 0.06 μmol (30% yield)
- (6) 5'-GCGXXTTTGGCT-3' (X2T4)
収量 0.06 μmol (30% yield)
- (7) 5'-GCGTTXXTGGCT-3' (T2X2T2)
収量 0.05 μmol (25% yield)
- (8) 5'-GCGTTTXXGCT-3' (T4X2)
収量 0.06 μmol (30% yield)
- (9) 5'-GCGXXXXXXGCT-3' (X6)
収量 0.06 μmol (30% yield)

(10) 5' -GTTTTTTTTTXXC-3' (X2)

収量 0.07 μ mol (35% yield)【0105】実験例1: 融解温度 (T_m) の測定

実施例2で合成した種々のオリゴヌクレオチド類縁体をアンチセンス鎖とし、天然のDNAあるいはRNAからなるセンス鎖とをアニーリング処理したものの融解温度 (T_m 値) を測定することにより、本発明のオリゴヌクレオチド類縁体の相補DNAおよびRNAに対するハイブリッド形成能を調べた。

【0106】終濃度をそれぞれ、NaCl 100 mM、リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.2) 10 mM、アンチセンス鎖 4 μ M、センス鎖 4 μ Mとしたサンプル溶液 (500 μ L) を沸騰水中に浴し、10時間をかけ*

*てゆっくり室温まで冷却した。分光光度計 (島津 UV-2100PC) のセル室内に結露防止のために窒素気流を通し、サンプル溶液を 5℃まで徐々に冷却し、さらに 20分間 5℃に保った後、測定を開始した。サンプル温度は 90℃まで毎分 0.2℃ずつ上昇させ、0.1℃間隔で 260 nmにおける紫外線吸収を測定した。なお、温度上昇とともにサンプル濃度が増加するのを防ぐため、セルは蓋付きのものを用い、サンプル溶液表面に鉱油を 1滴添加して測定した。

【0107】結果は、下記の表に示した。

表1. アンチセンスオリゴヌクレオチド類縁体の相補DNA及びRNAに対する融解温度 (T_m 値)

アンチセンス分子	相補 DNA ^{a)} との T_m (ΔT_m /mod.)	相補 RNA ^{b)} との T_m (ΔT_m /mod.)
5'-GCGTTTTTGGCT-3' (天然)	47℃	45℃
5'-GCGXTTTTTGCT-3' (XT5)	50℃ (+3℃)	49℃ (+4℃)
5'-GCGTTXTTGGCT-3' (T2XT3)	49℃ (+2℃)	49℃ (+4℃)
5'-GCGTTTXXGCT-3' (T3XT2)	49℃ (+2℃)	50℃ (+5℃)
5'-GCGTTTTXGCT-3' (T5X)	52℃ (+4℃)	51℃ (+6℃)
5'-GCGXXTTTTGCT-3' (X2T4)	51℃ (+2℃)	53℃ (+4℃)
5'-GCGTTXXTGGCT-3' (T2X2T2)	49℃ (+1℃)	53℃ (+4℃)
5'-GCGTTTTXXGCT-3' (T4X2)	54℃ (+3.5℃)	55℃ (+5℃)
5'-GCGXXXXXXGCT-3' (X6)	58℃ (+1.8℃)	71℃ (+4.3℃)

a): 3'-CGCAAAAACGA-5'. b): 3'-r(CGCAAAAACGA).

【0108】表から明らかなように、天然DNA鎖中に本発明のヌクレオチド類縁体 (一般式 (I a)) のユニット (X) が1個あるいは2個導入したオリゴマーでは、相補DNAオリゴマーとのハイブリッド形成能が、 T_m 値で評価して天然鎖よりも2-7度 (1修飾残基当たり2度程度) 上昇し、TをすべてXで置換した (X6) においては11度も上昇した。一方、相補RNAに対するハイブリッド形成能を評価したところ、1個あるいは2個導入したオリゴマーでは天然鎖よりも4-10度 (1修飾残基当たり4度から6度) の T_m 値の上昇が認められ、しかも (X6) においては相補RNAに対するハイブリッド形成能が更に強まり、 T_m 値が25度以上 (1修飾残基当たり4度) も上昇が認められた。このように、天然鎖よりも T_m 値がかくも上昇する類縁体の例がなく、またDNAよりもRNAに対する親和性が高いことは、本発明のビシクロオリゴヌクレオチド類縁体を構成単位としたオリゴヌクレオチド類縁体がアンチセンス分子として極めて高い性能と医薬品素材としての有用性を有していることを意味していると言える。

【0109】実験例2: ヌクレアーゼ酵素耐性の測定
15分間 37℃に保ったオリゴヌクレオチドのバッファー溶液 (10 μ M, 400 μ l) に蛇毒ホスホジエステラーゼのバッファー溶液 (0.003U/ml, 400 μ l) を混合した。混合溶

液を 37℃に保った石英セル (800 μ l) に入れ、オリゴヌクレオチドの分解による紫外外部吸収 (260nm) の増加をSHIMADZU UV-2100PCを用いて経時的に測定した。用いたバッファーの組成はTris-HCl (pH8.6) 0.1M、NaCl 0.1M、MgCl₂ 14mMであり測定前に十分に脱気した。

【0110】半減期 ($t_{1/2}$) の測定
測定開始時 ($t=0$) 及び紫外外部吸収が認められなくなった点のUV吸収の平均値を示す時間を半減期 ($t_{1/2}$) とした。

オリゴヌクレオチド配列	$t_{1/2}$ (秒)
5'-GTTTTTTTTTTC-3' (天然型)	260
5'-GTTTTTTTTT-XX-C-3' (X2)	850

【0111】また、紫外外部吸収の経時変化を示すチャートを図1 (天然鎖) 及び図2 (X2) に示した。天然鎖は酸素反応開始後、約30分で紫外外部吸収値が一定となり、X2では約90分で一定となった。

【0112】

【配列表】

出願人の氏名: 今西武

発明の名称: 新規ビシクロヌクレオチド及びオリゴヌクレオチド類縁体

整理番号: 972407

出願番号:

出願日：平成10年3月 日

優先権番号：特願平9-53409号

優先日：平成9年3月7日

配列の数：10

【0113】配列番号：1

配列の長さ：12

配列の型：ヌクレオチド

鎖の数：1本鎖

トポロジー：直鎖状

配列：

5'-GCGTTTTTTTGCT-3'

【0114】配列番号：2

配列の長さ：12

配列の型：ヌクレオチド、ヌクレオチド類縁体

鎖の数：1本鎖

トポロジー：直鎖状

配列：

5'-GCGXTTTTTTGCT-3'

【0115】配列番号：3

配列の長さ：12

配列の型：ヌクレオチド、ヌクレオチド類縁体

鎖の数：1本鎖

トポロジー：直鎖状

配列：

5'-GCGTTXTTTTGCT-3'

【0116】配列番号：4

配列の長さ：12

配列の型：ヌクレオチド、ヌクレオチド類縁体

鎖の数：1本鎖

トポロジー：直鎖状

配列：

5'-GCGTTTXXTTTGCT-3'

【0117】配列番号：5

配列の長さ：12

配列の型：ヌクレオチド、ヌクレオチド類縁体

鎖の数：1本鎖

トポロジー：直鎖状

配列：

5'-GCGTTTTTTXXGCT-3'

【0118】配列番号：6

配列の長さ：12

配列の型：ヌクレオチド、ヌクレオチド類縁体

鎖の数：1本鎖

トポロジー：直鎖状

配列：

5'-GCGXXTTTTTGCT-3'

【0119】配列番号：7

配列の長さ：12

配列の型：ヌクレオチド、ヌクレオチド類縁体

鎖の数：1本鎖

トポロジー：直鎖状

配列：

5'-GCGTTXXTTTGCT-3'

10. 【0120】配列番号：8

配列の長さ：12

配列の型：ヌクレオチド、ヌクレオチド類縁体

鎖の数：1本鎖

トポロジー：直鎖状

配列：

5'-GCGTTTTTXXGCT-3'

【0121】配列番号：9

配列の長さ：12

配列の型：ヌクレオチド、ヌクレオチド類縁体

20 鎖の数：1本鎖

トポロジー：直鎖状

配列：

5'-GCGXXXXXXXXGCT-3'

【0122】配列番号：10

配列の長さ：13

配列の型：ヌクレオチド、ヌクレオチド類縁体

鎖の数：1本鎖

トポロジー：直鎖状

配列：

30 5'-GTTTTTTTTTTTC-3'

【0123】配列番号：11

配列の長さ：13

配列の型：ヌクレオチド、ヌクレオチド類縁体

鎖の数：1本鎖

トポロジー：直鎖状

配列：

5'-GTTTTTTTTTTXXTC-3'

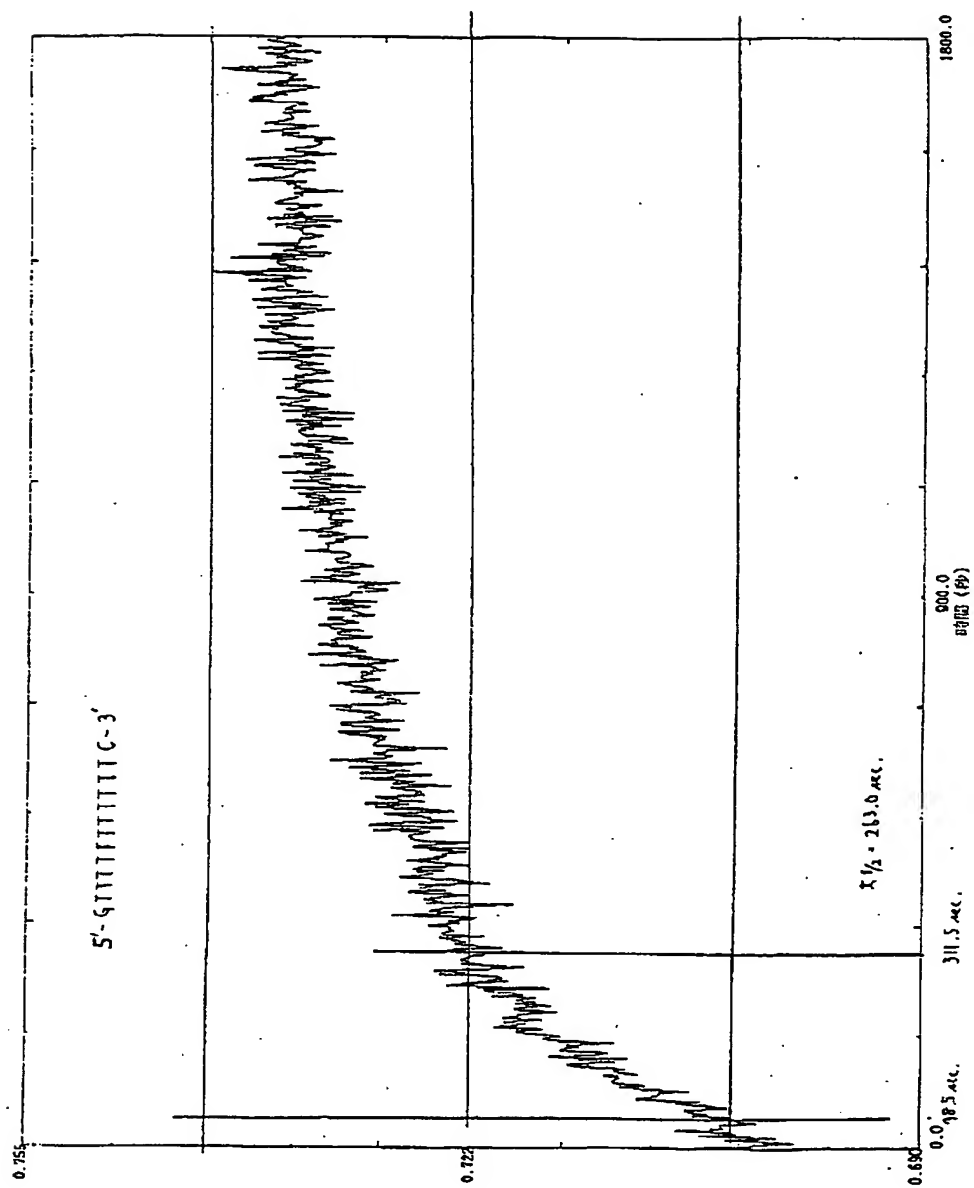
【図面の簡単な説明】

【図1】天然型のオリゴヌクレオチドをエキソヌクレアーゼで分解した時の紫外吸収(260nm)の経時変化を示すチャートである。

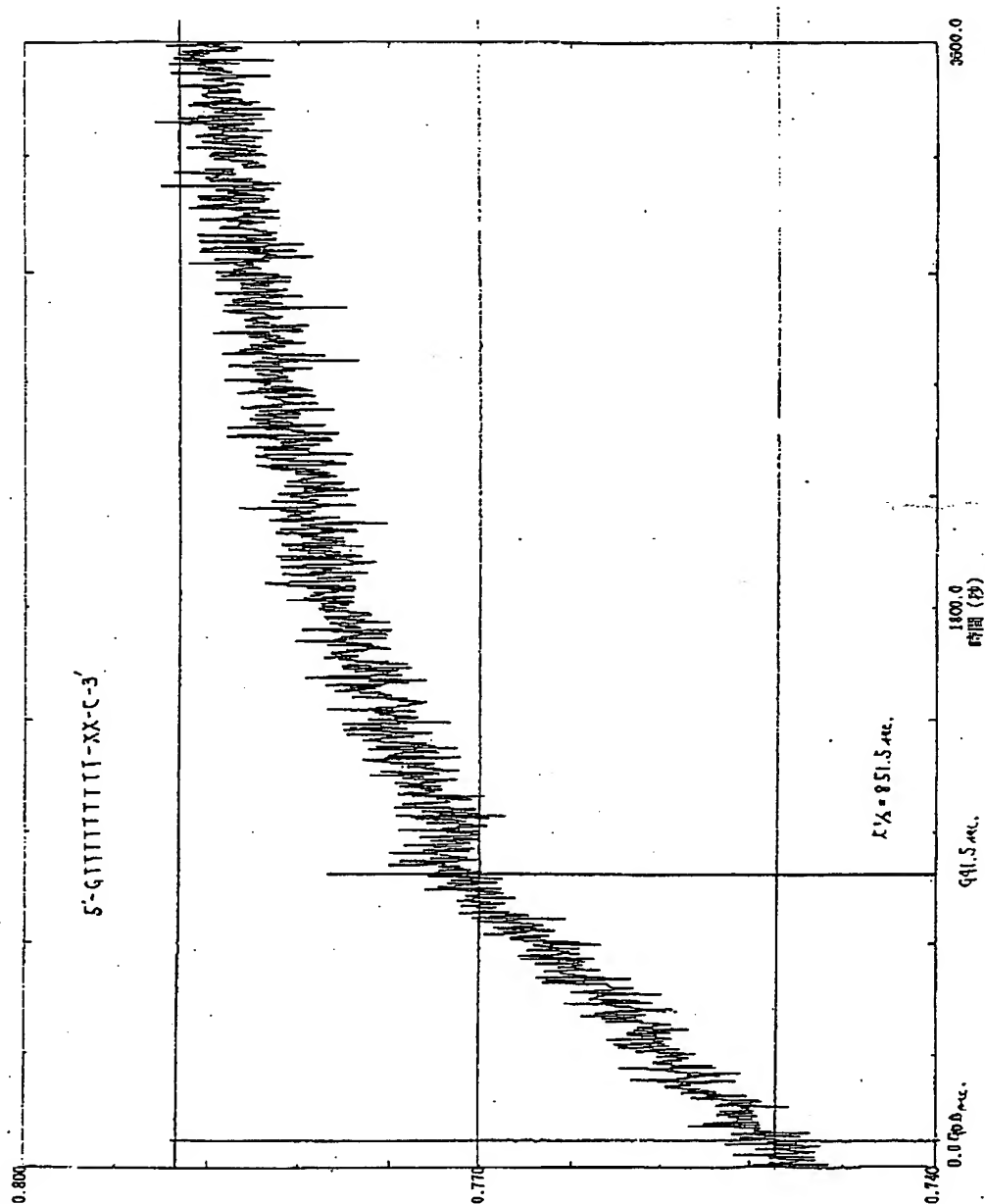
40

【図2】本発明のオリゴヌクレオチド(X2)をエキソヌクレアーゼで分解した時の紫外吸収(260nm)の経時変化を示すチャートである。

【図 1】



【図2】



フロントページの続き

(51) Int. Cl.⁶
 A 6 1 K 31/70
 48/00

識別記号
 ADY

F I
 A 6 1 K 31/70
 48/00

ADY